

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

Institut für Immunologie  
Leiter: Prof. Dr. D. Gerns

**Expression zellmobilitätsrelevanter Zytokine in der Lunge  
bei chronischer Silikose der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Andrea Kirchner**  
aus  
Erfurt

Marburg, den 1. März 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 6. Mai 1999

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Prof. Dr. D. Gemsa
Korreferent:	Prof. Dr. P. v. Wichert

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologie der Silikose	2
1.2. Silizium-Sauerstoff-Verbindungen	3
1.3. Klinik der Silikose	4
1.4. Silikose-assoziierte Erkrankungen	5
1.5. Auswirkungen der Siliziumverbindungen auf Zellen in der Lunge	7
1.6. Rekrutierung immunkompetenter Zellen in die Lunge bei Silikose	13
1.7. Chemokine	16
1.7.1. Die CC-Chemokine	17
1.7.2. Die CXC-Chemokine	20
1.8. Zielsetzung der Arbeit	22
 <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	 <b>23</b>
<b>2.1. Versuchstiere</b>	<b>23</b>
2.1.1. Tierhaltung	23
2.1.2. Silika-Exposition	23
2.1.3. Versuchszeitpunkt	23
<b>2.2. Zell-und Gewebspräparation</b>	<b>24</b>
2.2.1. Lungenpräparation	24
2.2.2. Gewebefixation für histologische Untersuchungen	24
2.2.3. Gewebe für RNA-Präparation aus Gesamtlunge	25
2.2.4. Präparation von Zellen aus verschiedenen Lungenkompartimenten	25
2.2.4.1. Präparation der Alveolarzellen durch BAL	25

2.2.4.2. Präparation der interstitiellen Zellpopulation	25
<b>2.3. Histologische Färbungen</b>	27
2.3.1. Gewebeschnitte	27
2.3.2. Immunhistologische Färbung (MIF, ED1)	28
2.3.3. Hämalaun-Eosin-Färbung	29
<b>2.4. Molekularbiologische Methoden</b>	30
2.4.1. Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellsuspensionen	30
2.4.1.1. Ethanol-Chloroform-Fällung	30
2.4.1.2. Isolation von mRNA mittels dT-Dynabeads	31
2.4.2. Herstellung von komplementärer DNA durch Reverse Transkription	32
2.4.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	33
2.4.4. Klonierung eines PCR-Produktes	36
2.4.5. Plasmidpräparation	37
2.4.6. DIG-Markierung von Nukleinsäuren	38
2.4.6.1. Herstellen DIG-markierter DNA-Sonden	38
2.4.6.2. Herstellen DIG-markierter RNA-Sonden	39
2.4.7. Nachweis von Nukleinsäuren	41
2.4.7.1. Spektrophotometrische Messung	41
2.4.7.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	41
2.4.7.2.1. DNA-Gele	41
2.4.7.2.2. RNA-Gele	42
2.4.7.3. Blotten	43
2.4.7.3.1. Nachweis von PCR-Produkten durch Dot-Blot	44
2.4.7.3.2. Northern Blot	46
2.4.8. Sequenzierung von DNA	48
2.4.8.1. Vorbereitung der DNA	48
2.4.8.2. Sequenzanalyse	50
2.4.9. Nachweis DIG-markierter DNA	52
2.4.9.1. Immundetektion	52
2.4.9.2. Farbnachweis	53
2.4.9.3. Chemilumineszenz	54

<b>2.5. Auswertung und statistische Methoden</b>	<b>55</b>
2.5.1. Auswertung von DNA Gelen und Blots	55
2.5.2. Statistische Auswertung	56
 <b>3. ERGEBNISSE</b>	 <b>57</b>
<b>3.1. Histologie der Lunge nach Inhalation von <math>\alpha</math>-Christobalit</b>	<b>57</b>
<b>3.2. Sequenzierung von Ratten MIF</b>	<b>60</b>
<b>3.3. Vergleich der mRNA-Expression von GAPDH, MIF und einigen Chemokinen in verschiedenen Zellpopulationen anhand eines Tiermodells der chronischen Silikose</b>	<b>63</b>
3.3.1. Analytierte Gewebe und Zellen	63
3.3.1.1. Zellen aus Gesamtlungengewebe	63
3.3.1.2. Zellen aus dem Alveolarraum und dem Interstitium der Lunge	64
3.3.2. DNA-Sonden für den Dot-Blot-Nachweis	64
3.3.3. GAPDH als „house-keeping-gene“	65
3.3.3.1. GAPDH-mRNA-Expression in Zellen aus Gesamtlungengewebe	66
3.3.3.2. GAPDH-mRNA-Expression in den Lungenpopulationen	67
3.3.4. MIF im Tiermodell der chronischen Silikose	69
3.3.4.1 Immunhistochemische Detektion von MIF-Protein	69
3.3.4.2. Expression der MIF-mRNA in der Gesamtlunge	70
3.3.4.3. Expression der MIF-mRNA in den Lungenpopulationen	71
3.3.5. Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener CC-Chemokine im Tiermodell der chronischen Silikose	74
3.3.5.1. Expression der MCP-1-mRNA in der Gesamtlunge	74
3.3.5.2. Expression der MCP-1-mRNA in den Lungenpopulationen	77
3.3.5.3. Expression der MIP-1 $\alpha$ -mRNA in der Gesamtlunge	78
3.3.5.4. Expression der MIP-1 $\alpha$ -mRNA in den Lungenpopulationen	79
3.3.5.5. Expression von RANTES-mRNA in der Gesamtlunge	82
3.3.5.6. Expression der RANTES-mRNA in den Lungenpopulationen	82

3.3.6. Expression der mRNA verschiedener CXC-Chemokinen im Tiermodell der chronischen Silikose	84
3.3.6.1. Expression der MIP-2-mRNA in der Gesamtlunge	85
3.3.6.2. Expression der MIP-2-mRNA in den Lungenpopulationen	86
3.3.6.3. Expression der GRO- $\alpha$ -mRNA in der Gesamtlunge	87
3.3.6.4. Expression von GRO- $\alpha$ -mRNA in den Lungenpopulationen	88
3.3.7. Untersuchung von iNOS im Tiermodell der chronischen Silikose	90
3.3.7.1. Expression der iNOS-mRNA in der Gesamtlunge	91
3.3.7.2. Expression der iNOS-mRNA in den Lungenpopulationen	91
 <b>4. DISKUSSION</b>	 94
<b>4.1. Tiermodell</b>	95
<b>4.2. Die untersuchten Zellpopulationen der Lunge</b>	96
<b>4.3. Veränderung der Zellzusammensetzung in der Lunge nach Inhalation von Christobalit</b>	101
<b>4.4. Zytokine mit Auswirkungen auf die Mobilität der Zellen bei chronischer Silikose</b>	102
4.4.1. Rekrutierung von Zellen in die Lunge bei chronischer Silikose	104
<b>4.5. Das Zusammenspiel der Zellen nach Christobalitinhalation</b>	111
 <b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	 116
 <b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	 118

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	aqua destillata
A549	humane Typ-II-Pneumozyten-Zelllinie
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	acute respiratory distress syndrome
AS	Aminosäure
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BALT	bronchus associated lymphatic tissue
bp	Basenpaar
cANCA	anti neutrophil cytoplasmatic antibody
CD	clusters of differentiation (Oberflächenmarker)
cDNA	copy DNA
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CXC-Chemokin)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-tri-phosphat
DTT	Dithiotreithol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENA-78	epithelial neutrophil activating protein-78 (CXC-Chemokin)
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GCP	granulocyte chemotactic protein (CXC-Chemokin)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor

GRO	growth-related oncogene (CXC-Chemokin)
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	4, (2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP-10	IFN- $\gamma$ inducible protein-10 (CXC-Chemokin)
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	monocyte chemoattractant protein (CC-Chemokin)
MHC	major histocompatibility complex
MIF	migration inhibitory factor
Mig	monokine induced by IFN- $\gamma$ (CXC-Chemokin)
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (CC-Chemokin)
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2 (CXC-Chemokin)
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NAP-2	neutrophil activating protein-2 (CXC-Chemokin)
OD	optische Dichte
p. e.	post expositionem
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	platelet derived growth factor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMN	polymorphkernige Granulozyten
PSS	Progressive systemische Sklerodermie
RANTES	<u>r</u> egulated upon <u>a</u> ctivation, <u>n</u> ormal <u>T</u> -cell <u>e</u> xpressed and <u>s</u> ecreted (CC-Chemokin)
RNA	ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies



RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SD	Standardabweichung
SLE	systemischer Lupus erythematodes
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRIS	Tri-hydroxymethylamino-methan
U	Unit (Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Nicht aufgeführte Abkürzungen wurden entsprechend den Empfehlungen für Autoren des European Journal of Biochemistry verwendet.

## 1. Einleitung

Der Respirationstrakt dient dem Gasaustausch zwischen Organismus und Umwelt. Zur ausreichenden Aufnahme von Sauerstoff ist eine große Kontaktfläche zwischen Luft und Blut notwendig, die beim Menschen durch die besondere Anatomie der Alveolen gewährleistet wird. Diese Austauschfläche, die circa die Größe eines Tennisfeldes hat, stellt aber auch eine riesige Eintrittspforte für Fremdstoffe in den menschlichen Organismus dar.

Deshalb hat der Körper Mechanismen entwickelt, sich vor diesen Fremdpartikeln zu schützen. Nach grobem Filtern der Luft in den Nasenconchae wird in den tieferen Atemwegen die Reinigung über das Flimmerepithel gewährleistet. Durch den Zilienschlag werden die in Schleim eingebetteten Partikel mit einer Geschwindigkeit von 1 cm/min retrograd aus der Lunge entfernt (Silbernagel, 1991). Gelangen Fremdkörper bis in die Bronchioli terminales und die Alveolen, werden sie zum einen mit Surfactant beschichtet und zum anderen von Alveolarmakrophagen inkorporiert. Jetzt sind sowohl ein Abtransport über die Lymphgefäße als auch ein Aushusten der Makrophagen möglich (Churg, 1996).

Neben diesen physiologischen Abwehrmechanismen sind auch pathologische Reaktionen möglich, die sowohl von der Beschaffenheit der eingeatmeten Substanzen als auch der individuellen Disposition abhängen.

Nach Inhalation organischer Stoffe, wie z.B. von Pollen, kann es zu einer entzündlich allergischen Reaktion kommen. Manche anorganische, sogenannte inerte Stäube, wie z.B. Kohle oder Titandioxid, werden ohne weitere Reaktion im Gewebe abgelagert oder via Lymphe abtransportiert. Einige anorganische Substanzen führen aber auch zu einer Fibrosierung der Lunge (Greskötter et al., 1996).

Dieser fibrotische Umbau des Lungengewebes nach Inhalation anorganischer Stäube wird als Pneumokoniose bezeichnet (Rubin und Farber, 1994).

Nach dem verursachenden Agens wird die Krankheit dann Silikose, Asbestose oder Berylliose (etc.) genannt. Bis heute sind über 40 verschiedene Substanzen bekannt, die zu fibrosierenden Lungenläsionen und radiologischen Veränderungen führen.

Die Silikose ist ein Prototyp einer knötchenförmigen Lungenfibrose. Sie ist schon lange Gegenstand der Forschung, zumal die Erkenntnisse aus der Silikoseforschung auch Rückschlüsse auf die Pathogenese anderer Pneumokoniosen ermöglichen (Seidel, 1995; Kane 1994).

## **Die Silikose**

### **1.1. Epidemiologie der Silikose**

Die Erdkruste setzt sich zu großen Teilen aus Silizium und seinen Oxidationsformen zusammen. Sobald der Mensch begann, Werkzeuge aus Stein zu fertigen, war er dem Erkrankungsrisiko der Silikose ausgesetzt. Bereits 460 v. Chr. beschrieb Hippokrates Luftnot bei Grubenarbeitern, die Untertage Metallerze abbauten (Rubin und Faber, 1994).

Erst 1866 wurde Siliziumdioxid als ätiologisches Agens der Silikose erkannt (Über und McReynolds, 1982).

Im 19. Jahrhundert war die englische Literatur voller Kasuistiken der Silikose. Bis in das zwanzigste Jahrhundert hinein stellte die Silikose eine der Haupttodesursachen von Quarzstaub-exponierten Arbeitern dar (Rubin und Farber, 1994).

Heute sind Arbeiter in Minen und Steinbrüchen, Beschäftigte bei Bohrarbeiten, im Tunnelbau und bei Sandstrahlarbeiten und in der Keramikindustrie Siliziumdioxidstaub als toxischem Agens ausgesetzt (Wagner, 1997).

In Deutschland wurde 1992 in einer Statistik der Berufsgenossenschaften die Silikose (BK Nr. 4101) mit einem Anteil von 5 % an allen Berufskrankheiten registriert (Deutsches Ärzteblatt, Dezember 1993).

In den USA war von 1979 bis 1992 die Silikose für 4882 Todesfälle verantwortlich (Wagner, 1997). Im Zeitraum von 1988 bis 1992 wurden in 4 Staaten der USA 447 Neuerkrankungen beobachtet (Work-Related Lung Disease Surveillance Report, 1994). Die tatsächlichen Zahlen liegen wahrscheinlich wesentlich höher, da es erst mit einiger zeitlicher Verzögerung nach der Inhalation zur Ausbildung klinischer Symptome kommt (Vautrin et al., 1989).

Trotzdem konnte in diesem Jahrhundert in industrialisierten Ländern ein Rückgang der Silikose verzeichnet werden (Valiante und Rosenmann, 1989). Das ist sehr wahrscheinlich auf eine zunehmend verbesserter Technologie und Einführung von Arbeitsschutzmaßnahmen zurückzuführen (Davis und Gemsa, 1996).

Da ein direkter Zusammenhang zwischen Silikoseprävalenz und steigender Staubexposition besteht (Hughes, 1995), wurden in Deutschland gesetzliche Höchstwerte festgelegt. Bezogen auf eine 40-Stunden-Arbeitswoche ist bei Unterschreiten dieses maximalen Arbeitsplatzkonzentrationswertes (MAK-Wert) mit keiner Gefährdung zu rechnen. Er beträgt für Siliziumdioxid  $0,15 \text{ mg/m}^3$  (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1997). In den USA liegt der empfohlene Höchstwert des National Institut for Occupational Safety and Health (NIOSH, USA) bei  $0,05 \text{ mg/m}^3$ .

Vor allem in Entwicklungsländern in Asien, Afrika und Südamerika werden aufgrund mangelnder präventiver Maßnahmen und expandierender Industrie bleibend hohe Silikoseinzidenzen verzeichnet (van Sprundel, 1990; Beckett et al., 1997).

## 1.2. Silizium-Sauerstoff-Verbindungen

Der klinischen Phänomenologie der Silikose soll eine Beschreibung der auslösenden Partikel vorangestellt werden, deren natürliche Quelle die Erdkruste ist (Thurlbeck, 1987).

Innerhalb des Atomgitters geht ein Siliziumatom eine Bindung zu vier Sauerstoffatomen ein, wobei diese von jeweils zwei benachbarten Siliziumatomen gebunden werden. Daraus resultiert die Form eines Tetraeders mit der chemischen Formel  $(\text{SiO}_2)_x$ .

Sind diese Tetraeder regulär angeordnet, liegt die kristalline Form vor. In Abhängigkeit von den Entstehungstemperaturen wird so Quarz und unter höheren Temperaturen Tridymit und dann Christobalit formiert. Bei noch höheren Drücken und Temperaturen kann auch Coesit und das oktaedrische Stishovit entstehen. Die letzteren wurden z.B. in einem Meteoritenkrater in Arizona gefunden (Thurlbeck, 1987).

Sind die Tetraeder unregelmäßig angeordnet, handelt es sich um die amorphe Form, die z.B. bei dem natürlich vorkommenden Obsidian und Vulkanglas vorliegt. Synthetisch wird amorphes  $\text{SiO}_2$  während des langsamen Abkühlens von geschmolzenem kristallinen Siliziumdioxid, z.B. bei der Produktion von Glas, Glasfieber und Keramik, gebildet (Davis und Gemsa, 1996).

Werden in die  $\text{SiO}_2$ -Verbindung andere Metallatome integriert, entstehen Silikate, wie z.B. Kaolin (Aluminiumsilikat) und Talk (Magnesiumsilikat).

Im Abschnitt 1.5. wird auf die Bedeutung der chemischen Charakteristika der Siliziumverbindungen detaillierter eingegangen.

### 1.3. Klinik der Silikose

Bis heute wurden vier verschiedene klinische Manifestationen beobachtet (Davis und Gemsa, 1996), die im folgenden kurz beschrieben werden sollen.

Am häufigsten tritt die **chronisch unkomplizierte Form** der Silikose auf. Sie verläuft meist symptomlos und führt lediglich zu radiologischen Veränderungen, vor allem in den Oberfeldern der Lunge. Man findet in der Röntgenaufnahme des Thorax kleine, rundliche Verschattungen unterschiedlicher Größe und Dichte und eine vermehrte streifige Zeichnung der Lunge durch die interstitielle Fibrose. Die radiologische Einteilung erfolgt nach der ILO-Klassifikation. Durch Abtransport der Staubpartikel über die Lymphwege kann es zu reaktiven Kalkeinlagerungen in den drainierenden Lymphknoten kommen. Deshalb findet man in Projektion auf die mediastinalen Lymphknoten eierschalenförmige Verkalkungen. Histologisch finden sich kleine silikotische Läsionen in der Lunge, die aus einem zellfreien Kollagezentrum mit lymphozytärem und fibroblastischem Randsaum bestehen. Erst 10 bis 30 Jahre nach der ersten Inhalation können klinische Symptome wie Dyspnoe, gehäufte Bronchitiden oder Komplikationen bzw. assoziierte Erkrankungen auftreten. Es können sowohl restriktive als auch obstruktive Ventilationsstörungen festgestellt werden. Diese veränderten Funktionsparameter der Lunge müssen jedoch bei vielen Patienten auch partiell auf den meist gleichzeitig vorliegenden, chronischen Nikotinabusus zurückgeführt werden.

Die **chronisch komplizierte, progrediente Fibrose** entwickelt sich aus einer länger bestehenden Silikose, wobei die Verschmelzung silikotischer Knötchen zu einem massiven restriktiven Umbau des Lungenparenchyms führt. Um diese Bindegewebsnarben herum kommt es zu einer Überblähung noch gesunden Lungengewebes. Es resultiert ein perifokales Emphysem, das zu weiterer Beeinträchtigung der Ventilation führt. Klinisch manifestiert sich die reduzierte Vitalkapazität als eine Hypoxämie. Durch die Fibrosierung des Lungeninterstitiums kann es zu einer chronischen Rechtsherzbelastung und zur Ausbildung eines Cor pulmonale kommen.

Die **akzelerierte Silikose** ähnelt der chronisch unkomplizierten Form, jedoch treten die Symptome bereits 2 bis 5 Jahre nach der Exposition auf. Diese Form ist selten, endet aber bereits wenige Jahre nach den ersten Anzeichen von Luftnot tödlich.

Die seltenste und schwerste Form ist die **akute Silikose**. Nach einer kurzzeitigen, hoch-konzentrierten Inhalation von Siliziumdioxidkristallen kommt es zu einer massiven Epithelschädigung. In den Alveolen finden sich infolgedessen ein Proteinexsudat, Lipide und Zelltrümmer. Diese pathologische Veränderung wird als alveolare Proteinose bezeichnet. Es kommt schnell zur respiratorischen Insuffizienz und zum tödlichen Ausgang.

## 1.4. Silikose-assoziierte Erkrankungen

Die Silikose ist mit einer großen Anzahl an Erkrankungen assoziiert, wobei die Kausalzusammenhänge in vielen Fällen noch zu erforschen sind. Allgemein kommt es bei der Ausbildung von Silikose zu einer Vielzahl immunologischer Veränderungen (Kane, 1994).

Silikosepatienten haben ein 3fach erhöhtes Risiko, an **Tuberkulose** zu erkranken (Sherson und Lander, 1990; Cowie, 1994). Als ursächlich wird eine veränderte Makrophagenfunktion diskutiert (Kane, 1994). Andererseits wirkt auch die veränderte Lungenstruktur mit Emphysembildung und Narbenarealen begünstigend für eine Manifestation der Tuberkulose.

Lange Zeit wurde kontrovers diskutiert, ob Silikose zu einer erhöhten Inzidenz des **Lungenkarzinoms** führt. Die epidemiologische Untersuchung ist vor allem durch die Koinzidenz der Siliziumdioxidinhalation mit Nikotin- und Radon-Exposition der Arbeiter erschwert (McDonald, 1989). Ratten entwickelten nach intratrachealer Siliziumdioxid-Instillation Lungentumoren, die den Bronchialkarzinomen vergleichbar waren (Muhle et al., 1989). Johnson konnte in Ratten durch Quarz-Inhalation periphere Tumoren der Typ-II-Pneumozyten induzieren (Johnson et al., 1987). Driscoll untersuchte Typ-II-Pneumozyten aus Ratten 15 Monate nach Quarz-Instillation und konnte bei ihnen eine erhöhte Mutationsrate des hprt-Genes feststellen. Bei Koinkubation von Zellen, die über Bronchoalveolarlavage (BAL) aus diesen Tieren isoliert wurden, mit einer Alveolarzelllinie trat ebenfalls eine erhöhte Mutationsrate in der Zelllinie auf, welche partiell auf die inflammatorisch entstehenden Radikale zurückgeführt werden muß (Driscoll et al., 1997). Trotz einer nur bedingten Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten wurde von der Agency of Research on Cancer Siliziumdioxid als Karzinogen der Klasse I für den Menschen eingestuft. Heute wird das erhöhte Risiko für Lungentumore bei Silikosepatienten als gesichert angesehen (Becket et al., 1997).

Interessant sind die klinischen Beobachtungen über eine Assoziation mit **Autoimmunerkrankungen**. Allgemein wurde bei der Silikose eine unspezifische, polyklonale B-Zell-Aktivierung beobachtet (Silicosis and Silicate Disease Committee, 1988). Die Bildung von Antikörpern gegen körpereigenes IgG (sogenannter Rheumafaktor) in Verbindung mit einer Arthritis und Silikose wurde als **Caplan-Syndrom** beschrieben (Caplan, 1953). Die progressive systemische Sklerodermie (**PSS**) kommt bei der Silikose gehäuft vor (Rodnan et al., 1967) bzw. ist von der ohne Silikose auftretenden Form nicht zu unterscheiden (Rustin et al., 1990).

Fallberichte konnten die Silikose als einen Risikofaktor für die rapid progressive, cANCA-positive **Glomerulonephritis** aufzeigen (Gregorini et al., 1993; Siebels et al., 1993).

Auch der **Lupus erythematoses** in der kutanen und systemischen Form, als Paradeerkrankung autoimmuner Genese, wird nach Quarzstaubexposition gehäuft beobachtet. Gemeinsame pathogenetische Mechanismen können

angenommen werden (Mehlhorn und Gerlach, 1990), vor allem dann, wenn die Erkrankung an SLE mit einer schweren Verlaufsform der Silikose einhergeht (Beckett et al., 1996).

Bei überdurchschnittlich vielen Silikose-Patienten wurden auch ohne Manifestation einer Autoimmunerkrankung erhöhte Spiegel antinukleärer Antikörper (ANA) festgestellt (Doll et al., 1981; Davis 1986).

Aus diesen klinischen Beobachtungen erwächst die Frage nach der Rolle und Art der Immunantwort nach Inhalation von Quarzstaub.

### **1.5. Auswirkungen der Siliziumverbindungen auf Zellen in der Lunge**

Nach Inhalation von Siliziumkristallen kommt es zu einer Fibrose der Lunge und zu systemischen Veränderungen. Die genauen Mechanismen, die dazu beitragen, sind letztendlich noch nicht bekannt. Wahrscheinlich wird die Toxizität der Stäube durch die Kombination von bestimmten physikalisch-mechanischen und chemischen Eigenschaften verursacht (Mossman und Churg, 1998). Dabei spielen Parameter wie Größe der Partikel, Form und Oberflächeneigenschaften eine wichtige Rolle und sollen im ersten Abschnitt dargestellt werden. Im zweiten Teil werden die sehr komplexen Interaktionen der Partikel mit den verschiedenen Zellen in der Lunge und die Koordination der Entzündung und Fibrose im Gewebsverband beschrieben.

Die zahlreichen Untersuchungen zur **Partikelgröße** ergaben unterschiedliche Resultate. Prinzipiell ist die Größe entscheidend für den Ort der Ablagerung und Wirkungsentfaltung von Siliziumdioxid. Partikel, die größer als 10 µm sind, werden bereits im Nasopharynx gefiltert. Bei einem Durchmesser von 2-10 µm werden die Partikel bis in die Bronchien und Bronchiolen inhaliert. Ein Großteil kann durch das mukoziliäre System exhalieren werden. Noch kleinere Partikel gelangen bis in die Alveolen, wo primär Alveolarmakrophagen als phagozytierende und reinigende Zellen vorliegen. Partikel, die kleiner als 1 µm sind, sollen direkt in das Interstitium gelangen können und dann über die



Lymphwege abtransportiert werden (Uber und McReynolds, 1982; Churg, 1996). King und Kollegen stellten dazu fest, daß Partikel in der Größe von 1-2  $\mu\text{m}$  in ihrem Modell am stärksten fibrinogen wirkten (King et al., 1956). Die Arbeitsgruppe um Wiessner hingegen beobachteten im Gegensatz dazu eine stärkere fibrogene Wirkung der 5  $\mu\text{m}$  großen Partikel im Vergleich zu 1  $\mu\text{m}$  messenden Stäuben (Wiessner et al., 1989). Die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Siliziumdioxide werden durch die Analyse der Größe nicht hinreichend erklärt.

Aus klinischen Beobachtungen hatte sich ein direkter Zusammenhang zwischen **Expositionsdauer bzw. -dosis** und der Schwere der Silikose herausgestellt, wobei eine kurze, aber starke Inhalation zu einer fulminanteren Erkrankung führt. Letztlich ist das Ausbildung der Silikose strikt dosisabhängig (Davis und Gemsa, 1996). Uber und McReynolds korrelieren das Auftreten der Silikose mit einer kumulativen Dosis (1982). Für eine Kumulation sind neben der Zufuhr auch das Entfernen (Clearance) wichtig. Hemenway et al. (1990) untersuchte die Bedeutung der Clearance von verschiedenen Quarz-Stäuben für die Bildung von Hydroxyprolin als Indikator der Fibrose. Er konnte, wie auch Pratt (1983), für das stärkste Fibrinogen seiner untersuchten Stäube auch die schlechteste Clearance aus der Lunge verzeichnen.

Da Kohlepartikel und Siliziumdioxid mit gleichem aerogenen Durchmesser und auch bei gleicher Dosis zu völlig unterschiedlichen Reaktionen des Organismus führen, wurden Analysen über spezifische **Oberflächeneigenschaften** der Siliziumverbindungen durchgeführt. Hemenway et al. (1993) untersuchten den Zusammenhang zwischen hämolytischem Potential von Partikeln und deren fibrogener Wirkung. Anhand des amorphen Siliziumdioxids, das stark hämolytisch, aber kaum fibrosierend wirkt, konnte eine positive Korrelation widerlegt werden. Auch die reine mechanische Irritationen des Gewebes durch Kristalle konnte von Gardner als Ursache falsifiziert werden. Er zeigte, daß Kurund-Partikel als besonders schorfige und feste Kristalle zu keiner Fibrose führten (Gardner, 1923).

Eine interessante Beobachtung ist, daß frisch frakturiertes Siliziumdioxid in vitro toxischer und aktivierender auf Alveolarmakrophagen wirkt als gealtertes (Vallyathan et al., 1991). Hierbei ist möglicherweise entscheidend, daß beim

Mahlen eine höhere Zahl an reaktiven Oberflächeneigenschaften freigelegt wird (Vallyathan et al., 1988).

An der Oberfläche von Siliziumdioxid finden sich prinzipiell 3 Arten **reaktiver Gruppen**, die mit Zellmembranen, und da vor allem mit den Phospholipiden reagieren können. Es handelt sich um Silanole, Siloxan-Brücken und Oberflächenradikale (Fubini et al., 1990). Diese Gruppen können zur Lipidperoxidation (Goodglick et al., 1989) bzw. Depolarisation der Mitochondrienmembran führen und so auch die Kalzium-Homöostase der Zellen beeinflussen (Gleva et al., 1990; Chen et al., 1991).

Auf amorphem  $\text{SiO}_2$  befinden sich deutlich weniger reaktive Gruppen als beispielsweise auf Quarz, was die Ergebnisse von Warheit erklären könnte. Er zeigte, daß amorphes Siliziumdioxid in Tierversuchen nur zu einer kurzzeitigen Entzündung führte, während die Inhalation von kristallinem  $\text{SiO}_2$  im selben Rattenmodell eine Entzündung über 3 Monate hinaus verursachte (Warheit et al., 1995). Die biologisch aktivste, fibrosierendste Form der Siliziumdioxide, das Christobalit, trägt im Gegensatz dazu die meisten dieser reaktiven Gruppen (Fubini et al., 1990).

Eine Oberflächenbeschichtung der Partikel, z.B. mit Surfactant-Proteinen, reduziert die Toxizität deutlich, was durch eine Neutralisierung reaktiver Prozesse erklärt werden könnte (Emerson und Davis, 1983; Wallace et al., 1985).

Für diese Theorie der reaktiven Gruppen sprechen auch eine Vielzahl empirischer Daten. In den seltensten Fällen kommt es zur Inhalation von reinem Siliziumdioxid. Kohlebergarbeiter inhalieren z.B. Siliziumkristalle, deren Oberflächen meist mit Kohlepartikeln beschichtet sind. Nur 1 bis 2 % haben eine reine  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche (Tourmann und Kaufmann, 1994). Die relativ niedrige Inzidenz der Silikose bei Kohlebergarbeitern könnte auf die niedrige Anzahl freier reaktiver Gruppen zurückgeführt werden, die durch andere Staubanteile verdeckt werden (Wallace et al., 1995). Bestätigend dazu ist die Inzidenz der Silikose bei Sandstrahlarbeitern, die frisch frakturiertem Quarz ausgesetzt sind, deutlich erhöht (Weill et al., 1994).

Für das Verständnis der Manifestation der Silikose ist nun entscheidend, mit welchen Zellen die Partikel in Kontakt kommen und welche Reaktionen daraus resultieren. Prinzipiell können Silikapartikel über drei Mechanismen zu einer Gewebsreaktion führen. Erstens können sie eine Nekrose der Zellen verursachen, zweitens können Botenstoffe phagozytierender Zellen zur Entzündung führen und drittens können andere Zellen angelockt werden, die dann eine gewebsschädigende Wirkung entfalten (Thurlbeck, 1987; Davis und Gemsa, 1996).

Eine wesentliche Rolle spielen die **Alveolarmakrophagen**, die inhalierte Substanzen phagozytieren und transportieren können (Brain, 1988).

Privalova et al. (1995) postulieren, daß wesentlicher Auslöser der Immunreaktion nach Quarz-Inhalation die Nekrose der Alveolarmakrophagen sei, die ihrerseits zur Entzündung führt. Kontrovers dazu sind jedoch zahlreiche in vitro-Untersuchungen, die nach einer Phagozytose der SiO<sub>2</sub>-Partikel durch Makrophagen keine Nekrose, sondern eine Aktivierung der Zellen in Form einer erhöhten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  messen konnten (Claudio et al., 1995; Piguet et al., 1990). Bei Titandioxid hingegen, einem schwächeren Fibrinogen, war ein zusätzlicher LPS-Stimulus nötig, um TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu induzieren (Driscoll et al., 1990). Alveolarmakrophagen aus silikotischen Tieren sezernieren dann in Kultur nach einem zusätzlichen Endotoxinreiz verstärkt TNF- $\alpha$  (Mohr et al., 1991).

TNF- $\alpha$  ist ein bedeutendes proinflammatorische Zytokin, das eine Vielzahl immunregulierender Funktionen hat. Es kann auf Makrophagen autokrin aktivierend wirken und T-Zellen stimulieren. Nach Quarzexposition kann TNF- $\alpha$  in Makrophagen die Expression der Chemokine MIP-1 $\alpha$  und MIP-2 induzieren (Driscoll et al., 1993a). Durch Christobalit aktivierte Makrophagen sezernieren neben den schon genannten Zytokinen auch Radikale (Gossart et al., 1996), Prostaglandine (Mohr et al., 1992a), Leukotriene (Mohr et al., 1992b) und Enzyme, wie Elastase und Kollagenase (Davis und Gemsa, 1996).

Außerdem setzen stimulierte Makrophagen Mediatoren frei, die auf Fibroblasten und Epithelzellen proliferativ wirken (Kane, 1980; Melloni et al., 1994). Dazu zählen nach Melloni u.a. PDGF, FGF und IGF-1. Auch das von Makrophagen sezernierte TGF- $\alpha$  ist bekannt für seine mitogene Wirkung auf

Epithel-und Mesenchymzellen. Im Tiermodell der Silikose wurden 5-fach erhöhte Spiegel festgestellt (Absher, 1993).

Die Expression von membranständigem Fibronektin (Wagner et al., 1982) und IL-1 $\beta$  (Dinarello und Wolff, 1993) anstelle von löslichen Mediatoren ist ein Grund für die Ausbildung von Makrophagen-Fibroblasten-Aggregationen. Für die Ausbildung von Granulomen ist aber möglicherweise auch das **MIF** ein wichtiger Regulator, der im folgendem Abschnitt kurz vorgestellt werden soll.

### **Migration Inhibitory Factor (MIF)**

Wie der Name des 1966 beschriebenen Zytokines besagt, kann es die ungezielte Wanderung (random migration) von Makrophagen hemmen (Bloom und Bennet, 1966). Wichtiger Produzent ist die aktivierte T-Zelle (Thor et al., 1968), später wurden auch die Makrophagen nicht nur als Zielzelle, sondern auch als mögliche Quelle des MIF erkannt (Calandra et al., 1994). In Makrophagen liegt es teilweise in Vesikeln präformiert vor (Calandra et al. 1994). Makrophagen sezernieren MIF auf LPS-Stimulation oder nach TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Aber auch eine Inkubation von Makrophagen mit Glukokortikoiden kann zur Ausschüttung von MIF führen, weshalb MIF als eine Art Gegenregulator der immunsuppressiven Wirkung der Glukokortikoide angesehen wird (Bacher et al., 1996). Viele andere Zellen, z.B. in der Adenohypophyse, können MIF produzieren (Bernhagen et al., 1993).

Erst 1989 wurde humanes MIF sequenziert (Weiser et al., 1989). Es hat eine hohe Homologie zu Glutathion-S-Transferase (GST) (Blocki et al., 1993), wobei es trotz einer hohen Glutathionbindungskapazität über keine GST-Aktivität verfügt (Sakai et al., 1994).

Rekombinantes MIF kann in Makrophagen die Expression von Antigen-präsentierenden MHC-Molekülen und von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  erhöhen. Ebenso ist MIF in der Lage, in Maus-Makrophagen eine verstärkte Produktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) auszulösen (Cunha et al., 1993). Möglicherweise steigert MIF über diesen Mechanismus in Makrophagen die Fähigkeit, verschiedene intrazelluläre Erreger wie z.B. *Mycobacterium avium* und *Leishmania donovani* abzutöten (Celada und Nathan, 1994). Auch die experimentell induzierte Typ-IV-Allergie

(Tuberkulintest) führt zu einer verstärkten Expression von MIF in den ortsständigen Makrophagen. Diese Reaktion kann durch neutralisierende anti-MIF-Antikörper gehemmt werden (Bernhagen et al., 1996). Beim akuten respiratorischen Atemnotsyndrom (ARDS), das auch in eine Fibrose der Lunge übergehen kann, findet man beim Menschen erhöhte MIF-Proteinspiegel in der BAL (Donnelly und Bucala, 1997). Über eine mögliche Bedeutung von MIF bei Pneumokoniosen existieren kaum Veröffentlichungen.

Nach Blackford et al. (1997) ist ein pathogenetisch wichtiger fibrosierender Faktor der Siliziumdioxidpartikel ihre Fähigkeit, in Makrophagen die Expression der induzierbaren NO-Synthase (**iNOS**) zu stimulieren. Eisen und Kohle sind dazu nicht in der Lage (Blackford et al., 1997).

Die induzierbare NO-Synthase kann ausgehend von der Aminosäure L-Arginin große Mengen an NO produzieren, die letztendlich den „oxidativen burst“, die Antwort von Makrophagen oder polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) auf verschiedenen Bakterien und Stäube durch sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) darstellen.

Im Gegensatz zu Inhalationsversuchen mit Kohlepartikeln tritt nach der frühen inflammatorischen Phase bei den Silikapartikeln zusätzlich eine Nekrose der Typ-I-**Pneumozyten** auf, welche ca. 96 % der Alveolenoberfläche auskleiden (Finkelstein, 1994). Diese Zellschädigung ist möglicherweise durch Proteasen der phagozytierenden PMN, aber auch den „oxidativen burst“ der Makrophagen bedingt (Bowden und Adamson, 1984a). Aufgrund der Zeitkinetik ist eine Schädigung direkt durch die Quarzkristalle weniger wahrscheinlich. Interessant ist, daß unabhängig von Makrophagen oder PMN in zahlreichen Experimenten eine Aufnahme von Quarz-Partikeln in die Typ-I-Pneumozyten beobachtet werden kann (Adamson et al., 1989; Churg, 1996).

Eine Schädigung der Pneumozyten könnte also direkt durch die Partikel oder durch Mediatoren von Entzündungszellen erfolgen. Die Schädigung scheint entscheidend für die Entstehung einer Fibrose sein. Zum einen ist eine Störung der Epithelzellbarriere denkbar, die es Alveolarmakrophagen oder auch freien Partikeln erleichtert, in das Interstitium überzutreten. Nach Adamson et al.

(1991) werden so interstitielle Makrophagen mit Quarzpartikeln konfrontiert und produzieren nach Phagozytose Fibroblasten-stimulierende Zytokine. Diese Freisetzung fibrogener Faktoren im Interstitium ist möglicherweise folgenreicher als lediglich eine Aktivierung der Alveolarmakrophagen. Darüber hinaus ermöglicht aber auch eine Beeinträchtigung der Epithelbarriere ein effektiveres Übertreten von Zytokinen aus der Alveole in das Interstitium (Adamson und Bowden, 1978; Absher et al., 1992).

Wesentlich ist weiterhin, daß die Typ-I-Pneumozyten durch eine reaktive Proliferation und damit Aktivierung von Typ-II-Pneumozyten ersetzt werden (Policard et al., 1967). Hyperplastische Pneumozyten Typ-II produzieren TGF- $\beta_1$ , welches autokrin das eigene Zellwachstum und parakrin die Proliferation von Fibroblasten reguliert (Williams et al., 1993).

Der übermäßige Regenerations-Stimulus kann möglicherweise zur Ausbildung karzinogener Mutationen führen (Driscoll et al., 1997).

Diese erhöhte Freisetzung fibrogener Zytokine aus Alveolarmakrophagen als auch Pneumozyten führt zu einer Aktivierung der Fibroblasten. Diese reagieren mit einer vermehrten Produktion von Extrazellulärmatrix, und es resultiert eine knötchenförmige Fibrosierung in der Lunge (Kane, 1994).

Darüber hinaus ist TGF- $\beta_1$  in der Lage, in Monozyten/ Makrophagen die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL1, und IL-6 zu stimulieren (Bogdan und Nathan, 1993).

## **1.6. Rekrutierung immunkompetenter Zellen in die Lunge bei Silikose**

Die Interaktion der Partikel mit ortsständigen Zellen kann über die parakrinen Effekte hinaus auch zur Rekrutierung anderer immunkompetenter Zellen führen und möglicherweise die Persistenz der Entzündungsreaktion nach Quarz-Inhalation unterstützen.

Nach Inhalation fast aller Stäube beobachtet man initial einen Einstrom neutrophiler Granulozyten, der zum Teil durch chemotaktisch wirksame Faktoren der Komplementkaskade (z.B. C5a) bedingt sein kann (Callis et al.,

1986). Dieser Einstrom neutrophiler Granulozyten scheint nicht essentiell für die Ausbildung der Silikose zu sein. Gavett und Kollegen konnten im Mausmodell zeigen, daß es durch Depletion der PMN mittels Antiserum zwar zu einer Reduktion der einströmenden PMN, aber dennoch zu einer gleich starken Schädigung der Lunge durch Siliziumdioxid kam (Gavett et al., 1992). Vergleicht man die Anzahl neutrophiler Granulozyten nach Inhalation von  $\text{SiO}_2$  mit  $\text{TiO}_2$ , beobachteten Yuen et al. (1996) in beiden Fällen eine maximale Neutrophilenanzahl in der BAL nach 5-6 h, die bei  $\text{SiO}_2$  über 10 Tage hinaus persistierte. Dabei war in den ersten 2 Tagen eine erhöhte mRNA für MIP-2 (siehe Abschnitt 1.7.2.) in Zellen der BAL meßbar, die dann am Tag 10 trotz weiterhin erhöhter PMN-Zahlen nicht mehr nachweisbar war.

Nach Absher (1989) tritt zusammen mit dem Einstrom neutrophiler Granulozyten auch eine Makrophagen-Akkumulation in der Lunge nach Christobalit-Inhalation auf die neben der oben beschriebenen Aktivierung der Makrophagen durch Quarzpartikel wesentlich an der Entstehung der Fibrose beteiligt sein kann. Ohne eine erneute Exposition gegenüber Siliziumdioxid beschrieben Adamson und Bowden (1985) bei der Maus einen zweiten Anstieg von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und auch der T-Zellen in der durch BAL gewonnenen Population.

Die Beteiligung der Lymphozyten an der Pathogenese der Silikose ist noch nicht umfassend geklärt. Kumar (1989) beschrieb im Mausmodell eine deutliche Zunahme der T-Lymphozyten in der Lunge nach Siliziumdioxid-instillation. Eine weitere interessante Untersuchung konnte an T-Zell-defizienten Mäusen (nude mice) gemacht werden, bei denen es im Gegensatz zu gesunden Tieren zwar zu einem gleich starken Zellanstieg in der BAL kam, jedoch in den nude mice nur Neutrophile und bei gesunden zusätzlich Makrophagen rekrutiert wurden. Die Fibrosierung setzte später ein, erreicht aber nach 60 Tagen vergleichbare Ausmaße (Hubbard, 1989).

Kontrovers dazu konnten Suzuki et al. (1996) im Nacktmausmodell eine deutlich geringere Fibrose nach Inhalation von Quarz im Vergleich zu Mäusen mit Thymus beobachten. Nach Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe war der Einstrom von Makrophagen in den Bronchoalveolarraum in beiden Gruppen gleich, jedoch fanden sich deutlich weniger neutrophiler Granulozyten in den T-Zell-

defizienten Tieren. Möglicherweise nehmen also T-Lymphozyten eine vermittelnde Rolle bei der Ausbildung einer Fibrose ein.

Die Vergrößerung mediastinaler Lymphknoten ist ein weiteres Indiz für die Beteiligung von Lymphozyten an der Krankheitsentstehung. Garn konnte in den vergrößerten Lymphknoten neben einer zahlenmäßigen Zunahme aller Zellen eine verstärkte Aktivierung v.a. der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten beobachten (Garn et al., 1997). Aktivierte T-Zellen können über verschiedenen Zytokine wie IL-2 oder IL-4 zu einer Aktivierung von B-Zellen führen. Dies kann ein ursächlicher Mechanismus für die Vielzahl der Silikose-assoziierten Erkrankungen angesehen werden, die mit einer polyklonalen Aktivierung von B-Lymphozyten einhergehen.

Die Fibrose nach Quarz-Exposition ist, wie bereits dargestellt, eine Folge komplexer Wechselwirkungen der Partikel mit ortsständigen Zellen. Interessant sind aber darüber hinaus die Mechanismen, die zu einer absoluten Zunahme immunkompetenter Zellen und veränderten Zellzusammensetzung in der BAL und dem Interstitium führen. Neben einer lokalen Proliferation, z.B. über den „Granulozyten Makrophagen- Kolonie stimulierenden Faktor“ (GM-CSF) vermittelt, ist auch ein selektives Anlocken wahrscheinlich.

Über diese Fähigkeit zur Rekrutierung von Makrophagen, Neutrophilen und auch Lymphozyten verfügen z.B. die Chemokine. Eine in diesem Zusammenhang interessante Untersuchung sind die Daten von Johnston und Mitarbeitern. Sie untersuchten die Chemokinexpression zweier Mausstämme, die auf eine Bestrahlung der Lunge mit unterschiedlich starker Fibrose reagierten. Dabei verfügte der Fibrose-sensitive Stamm (C57BL/6) über eine erhöhte mRNA-Expression für RANTES, IP-10 und MCP-1 im Vergleich zu dem nicht mit Lungenfibrose reagierendem Mausstamm (C3H/HeJ) (Johnston et al., 1998). Die Inhalation von Bleomycin führt zur Lungenfibrose und ist deshalb ein etabliertes Modell einer experimentell induzierten Pneumokoniose. Smith et al. (1995) konnte durch Gabe von Anti-MIP-1 $\alpha$ -Ak im Tiermodell die Induktion einer Fibrose durch Bleomycin abschwächen. Die Chemokine sind möglicherweise ein entscheidender Koordinator für die Ausbildung einer Silikose nach Quarz-Inhalation.



## 1.7. Chemokine

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar, die sich durch morphologische und funktionelle Gemeinsamkeiten herausheben. Der Name Chemokin leitet sich aus ihrer Fähigkeit ab, Leukozytensubpopulationen durch Chemotaxis anzulocken (engl. *chemoattractant cytokines*). Die Chemotaxis ist eine komplexe Reaktion von Zielzellen auf Chemokine. Die zirkulierende Zelle bildet unter Chemokinwirkung an ihrer Zelloberfläche Adhäsine aus (McEver, 1994), die eine Anheftung an das Gefäßendothel bewirken. Dadurch werden diese Zellen zur Auswanderung aus der Blutbahn angeregt (Butcher und Picker, 1996) und gelangen durch gesteigerte Zellmobilität entlang eines Chemokin-Gradienten zum Entzündungsort (Migration). Außerdem kann durch Chemokine eine Aktivierung der Zielzelle ausgelöst werden, die in Abhängigkeit vom Typ der Zielzelle zur Exozytose (Freisetzung intrazellulärer Granula), zu der Bildung von Arachidonsäuremetaboliten (z.B. Prostaglandinen und Leukotrienen), von reaktiven Sauerstoffspezies oder zu einer intrazellulären Kalzium-Mobilisierung führen kann.

Luster entdeckte 1985 das erste Chemokin, das IP-10. Seitdem wurde ein Vielzahl weiterer Vertreter entdeckt, wobei im humanen System bisher die meisten Chemokine beschrieben wurden und die Forschung in anderen Spezies mit diesem Tempo nicht Schritt halten kann.

Chemokine sind Heparin-bindende, basische Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 7 und 16 kDa (Oppenheim et al., 1991; Schall und Bacon, 1994). Die Homologie auf der Ebene der Aminosäuren beträgt 20 -40 % (Strieter et al., 1996). Die Tertiärstruktur wird durch die charakteristische Anordnung von 4 Zystein-(C) Gruppen und den zwischen ihnen ausgebildeten Disulfidbrücken bestimmt (Clowse und Gronenborn, 1995). Anhand dieser Strukturen wurden die Chemokine in verschiedene Gruppen unterteilt. Innerhalb dieser Gruppen verfügen die einzelnen Mitglieder neben den strukturellen auch über funktionelle Gemeinsamkeiten.

Die CC-oder auch  $\alpha$ -Chemokine besitzen zwei benachbarte Zysteine, während bei den CXC-oder  $\beta$ -Chemokinen die ersten beiden Zysteine durch eine variable Aminosäure getrennt sind (Oppenheim et al., 1991). Inzwischen

wurden zwei weitere Untergruppen beschrieben. Den C- oder  $\gamma$ -Chemokinen mit dem bisher einzigen Vertreter „Lymphotactin“ fehlt das erste und dritte der konservierten Zysteine (Kelner et al., 1994; Kennedy et al., 1995). Die erst kürzlich entdeckten CX<sub>3</sub>C-Chemokine Fraktalkin und Neurotaktin haben zwischen den ersten beiden Zysteinen 3 trennende Aminosäuren (Bazan et al., 1997; Schall, 1997; Pan et al., 1997).

Bezüglich der synthetisierenden Zellen kann festgestellt werden, daß Monozyten wichtige Produzenten der CC- als auch der CXC-Chemokine darstellen (Baggiolini et al., 1994), während Lymphozyten vor allem CC-Chemokine sezernieren (Schall et al., 1992). Darüber hinaus sind viele Zellen außerhalb des Immunsystems zur Synthese von Chemokinen befähigt.

Die Expression von Chemokinen wird oft durch primär inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  induziert, und deshalb können sie als sekundäre proinflammatorische Mediatoren angesehen werden (Graves und Jiang, 1995).

Die Wirkung der Chemokine auf die entsprechenden Zielzellen entfaltet sich über spezifische Chemokin-Rezeptoren, die an ein G-Protein gekoppelt sind. Dabei gibt es sowohl spezifische, als auch gemeinsam nutzbare Rezeptoren. MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES kompetieren z.B. um die Rezeptorbindungsstellen auf humanen Monozyten. RANTES kann aber die Bindung von MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  nicht blockieren, so daß es wahrscheinlich ist, daß sie sowohl separate als auch gemeinsame Rezeptoren besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemokine untersucht, die schon in der Ratte charakterisiert wurden. Die folgende Beschreibung geht jedoch auch auf Daten aus dem humanen System ein, um einen umfassenden Überblick über diese Zytokingruppe zu vermitteln.

### **1.7.1. Die CC-Chemokine**

Die CC-Chemokine wirken vor allem auf Monozyten, Makrophagen und T-Zellen chemotaktisch und aktivierend. Aber auch Basophile, Eosinophile und NK-Zellen können durch sie aktiviert werden (Schall und Bacon, 1994).

Die Gene der derzeit bekannten humanen CC-Chemokine werden auf Chromosom 17 kodiert (Howard et al., 1996). Die Gruppe umfaßt MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  (Lapes et al., 1988), RANTES (Schall et al., 1988), I-309 (Miller et al., 1989), MCP-1 (Yoshimura et al., 1989), MCP-2 (Chang et al., 1989), MCP-3 (Van Damme et al., 1992), MCP-4 (Uguccioni et al., 1996) und MCP-5 (Sarafi et al., 1997). In dieser Arbeit wurden die in der Ratte bereits beschriebenen Chemokine MCP-1, MIP-1a und RANTES untersucht.

## **MCP-1**

Das monocyte chemotactic protein-1 (**MCP-1**) ist das am besten charakterisierte Mitglied der CC-Chemokine. Es wurde zeitgleich aus verschiedenen Zelllinien isoliert und u.a. als MCAF (monocyte chemotactic and activating factor ) bzw. GDCF (Glioma derived chemotactic factor) bzw. in der Maus als PDGF-inducible gene beschrieben (Rollins et al., 1988).

In Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, B-Zellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen ist MCP-1 durch inflammatorische Reize induzierbar.

MCP-1 wirkt in vivo und in vitro chemotaktisch auf Monozyten. Neben der chemotaktischen Wirkung auf diese Zellen kann MCP-1 die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und lysosomaler Enzyme in den Makrophagen induzieren (Rollins et al., 1991) und sich auf zytosolische Kalziumspiegel, Expression von Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Zytokinen auswirken (Jiang et al., 1992).

MCP-1 ist chemotaktisch für Basophile und induziert, wirksamer als viele andere Zytokine, die Freisetzung von Histamin (Kuna et al., 1992). Nach Carr et al. (1994) spielt MCP-1 auch eine große Rolle bei der T-Zellmigration.

In vivo-Studien ergaben, daß bei verschiedenen Krankheiten eine erhöhte MCP-Expression vorliegt. Dazu gehören z.B. die Arteriosklerose (Yla-Herttuala et al., 1991), die idiopathische Lungenfibrose (Iyonaga et al., 1994) und die rheumatoide Arthritis (Villiger et al., 1992).

Im Tiermodell der Ratte beobachteten Sakanashi et al. (1994) nach Bleomycininstillation eine erhöhte MCP-1-mRNA Expression, v.a. in Alveolar- und Interstitialmakrophagen und PMN, begleitet von einer erhöhten Anzahl an Alveolarmakrophagen und mit einiger Latenz der interstitiellen Makrophagen.

Isolierte Fibroblasten aus Rattenlungen reagierten auf eine Inkubation mit MCP-1 dosisabhängig, aber zeitlich verzögert mit einer gesteigerten Kollagensynthese (Gharaee-Kermani et al., 1996).

### **MIP-1 $\alpha$**

Die Chemokine Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  sind zwei strukturell sehr ähnliche Proteine, die von murinen, durch LPS stimulierten Makrophagen freigesetzt werden (Wolpe und Cerami, 1989).

MIP-1 $\alpha$  mRNA wird in ruhenden Zellen nicht exprimiert. Durch verschiedene Stimuli ist jedoch die Induktion der mRNA Synthese in T- und B-Zellen, Monozyten und Mastzellen möglich. In Alveolarmakrophagen wird durch TNF- $\alpha$ , LPS oder Adhärenz eine MIP-1 $\alpha$ -mRNA-Expression induziert (Driscoll et al., 1994). Shi et al. (1995) zeigten in einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie aus der Ratte, daß es nach LPS-Reiz zu einem verzögerten Abbau der mRNA kommt.

MIP-1 $\alpha$  wirkt chemotaktisch auf Monozyten (Lukacs et al., 1994), T- und B-Lymphozyten (Taub et al., 1993), ebenso auf basophile und eosinophile Granulozyten. Es kann in Eosinophilen eine Degranulation auslösen (Rot et al., 1992) und Basophile und Mastzellen zur Freisetzung von Histamin stimulieren (Alam et al., 1992).

Smith et al. (1994) fanden bei Ratten mit Bleomycin-induzierter Fibrose eine erhöhte mRNA-Expression für MIP-1 $\alpha$  in der Lunge, wobei diese wahrscheinlich über eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Sekretion ausgelöst wurde.

### **RANTES**

RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) wurde erstmals in der mRNA aktivierter T-Lymphozyten gefunden (Schall et al., 1988). Später wurde entdeckt, daß es auch von Thrombin-stimulierten Blutplättchen freigesetzt wird (Kameyoshi et al., 1992). Darüber hinaus kann es von Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert werden (Heeger et al., 1992; Rathanashwami et al., 1993; Devergne et al., 1994).

Wie alle CC-Chemokine ist es Chemotaxin für Monozyten. Es wirkt außerdem anziehend auf T-Zellen und induziert Migration und Degranulation von Eosinophilen (Kameyoshi et al., 1992; Rot et al. 1992) und Basophilen (Kuna et al., 1992).

Kodama et al. (1998) untersuchten die BAL-Flüssigkeit verschiedener Patienten und die enthaltenen Zellen auf den Proteingehalt und die mRNA-Expression von RANTES. Bei Patienten mit Sarkoidose bzw. idiopathischer Lungenfibrose (IPF) fanden sich im Vergleich zu Gesunden erhöhte RANTES-Werte, die positiv mit der Zahl der Lymphozyten in der BAL korrelierten.

### **1.7.2. Die CXC-Chemokine**

Die CXC-Chemokine wirken vor allem auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch und aktivierend; Lymphozyten und Basophile reagieren wesentlich schwächer (Schall und Bacon, 1994). Wichtige Vertreter dieser neutrophilen-Chemotaxine sind das IL-8 (Walz et al., 1987), GRO- $\alpha$  (Richmond und Thomas, 1988), GRO- $\beta$  und - $\gamma$ , die auch MIP-2 $\alpha$  bzw. - $\beta$  genannt werden (Haskill et al., 1990). Die bisher genannten und auch ENA-78 (Walz et al., 1991), NAP-2 (Walz und Baggiolini, 1990) und GCP-2 (Proost et al., 1993) gehören zu denjenigen CXC-Chemokinen, die ein ELR-Motiv, eine weitere fixierte Aminosäureabfolge besitzen.

Nicht ELR-tragende CXC-Chemokine ähneln funktionell eher den CC-Chemokinen und rekrutieren v.a. mononukleäre Zellen. Zu dieser Gruppe gehören im humanen System das IP-10 (Kaplan et al., 1987), Mig (Farber, 1993), PF-4 (Deuel et al., 1977) und SDF-1 (Tashiro et al., 1993).

Das in der Ratte beschriebene CINC-3 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) und das rat-MIP-2 sind Synonyme (Nakagawa et al, 1996) und wahrscheinlich Homologe zum humanen GRO (Watanabe et al., 1991).

Aus oben genannten nomenklatorischen Überschneidungen zwischen den Spezies sind aber auch Schwierigkeiten der Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus Tiermodellen auf den Menschen absehbar.

Für Patienten mit idiopathischer Fibrose wurde die Infiltration der Lunge mit Neutrophilen als ein wesentlicher Schädigungsfaktor postuliert. Carre et al.

(1991) verglichen deshalb die IL-8-Produktion von Makrophagen aus IPF-Patienten mit Gesunden. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL korrelierte positiv mit der vermehrten Expression der IL-8-mRNA und der Schwere der Erkrankung. Da für das gut charakterisierte IL-8 des Menschen in der Ratte noch kein Homolog beschrieben ist (Miller et al., 1992), wurden in der vorliegenden Arbeit die Chemokine GRO- $\alpha$  und MIP-2 in der Ratte untersucht.

### **GRO- $\alpha$**

Diese Chemokin wurde erstmalig aus malignen Melanomzellen isoliert und MGSA (melanoma growth stimulating activity) genannt (Richmond et al., 1988). Der jetzige Name growth related cytokine leitet sich aus der Beobachtung ab, daß es in normalen Zellen während des Wachstums und in anderen Tumorzelllinien exprimiert wird (Sager et al., 1992).

GRO- $\alpha$  wird von Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen, Fibroblasten, Keratinozyten und Epithelzellen gebildet (Baggiolini et al., 1994).

### **MIP-2**

„Macrophage inflammatory protein-2“, auch als MIP-2 bezeichnet, ist ein Vertreter der CXC-Chemokine. Interessant ist der synergistische Effekt dieses Chemokines mit GM-CSF und M-CSF.

In vielen akuten Entzündungsmodellen wurde seine Expression untersucht. Wird es intratracheal appliziert, führt es zu einem signifikantem Einstrom von PMN und einer milden Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies durch PMN (Frevert et al., 1995). Es kommt nach Instillation von SiO<sub>2</sub> in die Lunge von Ratten zu einer erhöhten mRNA-Expression in Zellen des terminalen Bronchioli, der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ II, die jedoch nach 10 Tagen trotz persistierender Neutrophilen-chemotaktischer Wirkung der BAL nicht mehr nachweisbar ist (Yuen, et al 1996).

## 1.8. Zielsetzung der Arbeit

Die Inhalation von Siliziumdioxid führt zu komplexen Veränderungen in der Lunge und im gesamten Organismus. Zahlreiche Arbeiten existieren bereits über die Interaktion der Partikel mit den Alveolarmakrophagen, die ein wichtiges, erstes Schutzschild gegen inhalative Noxen darstellen. Auch die Wechselwirkungen der Partikel mit den Pneumozyten wurde von einigen Arbeitsgruppen untersucht.

In dieser Arbeit sollen anhand eines Tiermodells für die unkomplizierte Silikose Faktoren untersucht werden, die den Entzündungsprozeß auch über die Zeit der Exposition hinaus unterhalten und damit zu Chronifizierung beitragen.

Basierend auf der Beobachtung, daß es nach Inhalation von Partikeln zu einer Zunahme verschiedener Entzündungszellen in der Lunge kommt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob dies in einer verstärkten Anlockung von Zellen durch z.B. Chemokine begründet ist. Dazu sollte die Expression sowohl Neutrophilen- als auch Monozyten-anlockender Chemokine in der chronischen Phase der Silikose untersucht werden. Durch eine getrennte Analyse von Zellen aus dem belüfteten Alveolarraum und Zellen des Interstitiums soll versucht werden, die Chemokinexpression einzelnen Zellpopulationen zuzuordnen.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Versuchstiere**

#### **2.1.1. Tierhaltung**

Für die Untersuchung von Silikose am Tiermodell wurden männliche Fischer 344 Ratten verwendet, die vom National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) bezogen wurden. Die Exposition gegenüber Staubpartikeln wurde freundlicherweise an der Votey Animal Inhalation Facility der Universität Vermont (Dr. S. Davis und Dr. D. R. Hemenway, Burlington, Vermont, USA) durchgeführt. Nach der Überführung nach Deutschland wurden die Tiere in einem klimatisierten Tierstall (Universität Marburg) bei 18 -22 °C und 40% Luftfeuchtigkeit in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit Nahrung und Wasser ad libitum gehalten.

#### **2.1.2. Silika-Exposition**

Zum Zeitpunkt der Exposition waren die Tiere ca. 7 Wochen alt und wogen etwa 165 g. Nach dem von Hemenway und MacAskill (1982) beschriebenen Expositionssystem wurden die Ratten in einer horizontal durchströmten Kammer an 8 aufeinanderfolgenden Tagen für je 6 h einem Silika-Aerosol ausgesetzt. Das Aerosol enthielt Christobalit-Partikel (C & E Mineral Corp., King of Prussia, PA, USA) in einer Konzentration von  $11,21 \pm 4,14 \text{ mg/m}^3$ . Zu 77 % waren die Partikel kleiner als  $3,3 \text{ }\mu\text{m}$  in der größten Ausdehnung und zu 55 % kleiner als  $2,0 \text{ }\mu\text{m}$ . Sie hatten damit eine Größe, mit der sie bis in die Alveolen eingeatmet werden konnten. Simultan wurden die Kontrolltiere gefilterter Luft exponiert.

#### **2.1.3. Versuchszeitpunkt**

Die Tiere wurden 12 Monate post Expositionem (p. e.), also im chronisch manifesten Stadium der Erkrankung, durch Intoxikation mit CO<sub>2</sub> getötet. Unmittelbar im Anschluß wurden die folgenden Präparationen vorgenommen.



## 2.2. Zell-und Gewebspräparation

### 2.2.1. Lungenpräparation

Über einen medianen Halsschnitt und Lateralisation der Schilddrüsenlappen und Halsmuskeln wurde die Trachea freigelegt. In die Luftröhre wurde dann eine Kanüle eingebracht und mit Fäden fixiert. Über diesen Zugang waren im folgenden Beatmung, Spülung oder Einbringung von Fixantien möglich. Im Anschluß daran wurde vom Abdomen aus der Thorax entlang des Brustbeines eröffnet. Bindegewebsfasern wurden durchtrennt und die Thoraxorgane, also Herz, Lunge, mediastinale Lymphknoten, Ösophagus und die Venae cavae zusammenhängend entnommen.

### 2.2.2. Gewebefixation für histologische Untersuchungen

Das Anfertigen von Paraffinschnitten erforderte eine spezielle Fixation des Lungengewebes. Dazu wurden über die Trachealkanüle ca. 12 ml einer 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) in PBS (pH 7,2) instilliert, um das Zusammenfallen der Alveolen zu minimieren. Nach etwa 20 min konnte die so vorfixierte Lunge in Würfel von  $(0,5\text{ cm})^3$  geschnitten werden. Die Fixation in selbiger PFA-in-PBS-Lösung wurde bei 4 ° C über 4h fortgesetzt.

Im Anschluß daran wurden die Organstücke 2 x 30 min in PBS gewaschen. PBS wurde jeweils aus folgender Stammlösung verdünnt:

<b>10 x PBS</b>	NaCl	87 g
ad 1 l A. dest.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g

Die sich nun anschließenden Schritte dienten der Gewebsentwässerung und damit der Vorbereitung zur Einbettung in hydrophobes Paraffin.

Nach mindestens 2 h in 70 % Ethanol, folgten Inkubationen für 2 h in 90 % Ethanol, erneut 1 h in 90 % Ethanol, dann 3 x 1,5 h in Isopropanol, 3 x 2 h in Methylbenzoat und 2 x 2 h in Paraplast. Die so präparierte Lunge wurde nun in Paraffin eingegossen.

### **2.2.3. Gewebe für RNA-Präparation aus Gesamtlunge**

Die Lunge wurde sofort nach der Entnahme in Stücke mit ca. 0,5 cm Kantenlänge geschnitten und in 2 ml Cryoröhrchen (Greiner Nürtingen) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -80 ° C gelagert.

### **2.2.4. Präparation von Zellen aus verschiedenen Lungenkompartimenten**

Um aus der Lunge spezifische Zellen zu isolieren, mußte das Lungengewebe blutfrei gespült werden, um eine Verunreinigung der Zellpopulationen mit immunologischen Zellen aus dem zirkulierenden Blut zu vermeiden. Dazu wurde über den rechten Ventrikel in die Arteria pulmonalis ein Infusionsbesteck eingeführt, worüber dann eine 37 ° C warme Pufferlösung (Zusammensetzung siehe unten) gegeben wurde. Während dessen wurde die Lunge simultan über die Trachealkanüle mit einer 10 ml Spritze ventiliert, bis die perfundierte Lunge blutleer gespült war.

#### **2.2.4.1. Präparation der Alveolarzellen durch BAL**

Über die Trachealkanüle erfolgte eine Bronchoalveolare Lavage (BAL) mit 15 x 6-7 ml 4 ° C kalter PBS<sup>def</sup> ohne Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>-Ionen (Biochrom, Berlin). Unter leichter Gewebsmassage wurde die entweichende Flüssigkeit in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Diese Einzelzellsuspension wurde für 10 min bei 250 x g bei 4 ° C zentrifugiert und zweimal mit PBS<sup>def</sup> ohne Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>-Ionen gewaschen.

#### **2.2.4.2. Präparation der interstitiellen Zellpopulation**

Die verwendete Präparationsmethode basiert auf Arbeiten von S. Amann (1996), die eine modifizierte Technik von Dobbs anwandte (Dobbs et al, 1986). Ein ähnliches Vorgehen wurde auch von Johansson zur Separation von interstitiellen und alveolaren Makrophagen eingesetzt (Johansson et al. 1997).

Zum Perfundieren der Lunge und zur Zellpräparation wurde folgende Pufferlösung eingesetzt.

<b>Puffer für Zell- Präparation</b> (Menge für ein Tier)	NaCl	200 ml
	KCl	8 ml
	CaCl	4 ml
	MgSO <sub>4</sub>	2 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 ml
	HEPES-Puffer (0,2 M, pH 7,4)	12 ml
	D-Glukose	0,25 g

In diesem Puffer wurden folgende, lyophilisierte Enzyme kurz vor der Verwendung gelöst:

<b>Elastase-Lösung</b>	Elastase (High Purity, Nr. EC134, Firma EPC, Owensville, Missouri, USA; Vertrieb über WAK, Bad Homburg	1800 U
	Präparationspuffer (siehe oben)	60 ml
	Trypsin Typ III (Nr. T.8253, Sigma, München)	0,86 mg

<b>DNase-Lösung</b>	DNase I, Grad II (Bovine pancreas, Sigma, München)	2 mg
	Präparationspuffer (siehe oben)	2 ml

Nach Durchführung der unter 2.2.4.1. beschriebenen Alveolarlavage wurde die Lunge durch zweimaliges Spülen mit 37 ° C warmer, über die Trachealkanüle applizierter Pufferlösung temperiert. Danach wurde die Lunge mit 10 ml Elastase-Lösung gespült. Anschließend wurde die Lunge erneut mit 10 ml Elastase-Lösung gefüllt und in isotonischer Kochsalzlösung bei 37 ° C für 10 min inkubiert. Durch diese Prozedur wurde das Lungeninterstitium so porös, daß die restliche, über die Trachealkanüle gegebene Enzymlösung frei aus dem Lungengewebe abtropfte.

Das Lungenparenchym wurde von großen Bronchien, der Trachea und anderen Organe getrennt und nach Zugabe der DNase-Lösung mittels einer

Schere gründlich zerkleinert. Dem entstandenen Gewebebrei wurden 4 ml FCS (37 ° C, Gibco, Eggenstein) zugegeben und durch zweiminütiges Schwenken bei 37 ° C die Proteasen inaktiviert.

Die vorliegende Suspension wurde durch ein-, dann zweischichtige Gaze und letztlich durch Nylongaze (Porengröße 150 µm) gefiltert und mit dem Präparationspuffer bis auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde bei 250 x g 10 min bei 4 ° C zentrifugiert und zweimal mit PBS<sup>def</sup> ohne Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>-Ionen gewaschen.

## **2.3. Histologische Färbungen**

### **2.3.1. Gewebeschnitte**

Zur Herstellung von Paraffinschnitten mußten die Objektträger zur besseren Haftung des Gewebes beschichtet werden. Dazu wurde Chromalaun-Gelatine verwendet.

In 200 ml A. dest. wurde unter Wärmezufuhr 0,1 g Kaliumchrom-III-Sulfat gelöst und dann 1 g Gelatine zugegeben. Diese Flüssigkeit wurde mit einem Tuch gleichmäßig auf den Objektträgern verteilt. Anschließend wurden diese getrocknet und bis zur Verwendung trocken aufbewahrt.

Vom in Parafinblöckchen eingebetteten Lungengewebe wurden mittels eines Schlittenmikrotoms 5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf die beschichteten Objektträger aufgezogen. Diese wurden dann über Nacht bei 37 ° C getrocknet. Vor der Färbung wurden die Präparate durch Inkubation in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe wieder hydratisiert, um wasserlöslichen Farbbestandteilen eine Reaktion zu ermöglichen.

### **2.3.2. Immunhistologische Färbung (MIF, ED1)**

Antikörper erkennen spezifische Epitope auf der Oberfläche oder im Zytoplasma bestimmter Zellen. Über ein Detektionssystem können dann die gebundenen Antikörper im Gewebsverband nachgewiesen werden. Somit können die Antigene verschiedenen Zellen genau zugeordnet und werden.

Der Antikörper ED1 (Serotec LTD, Oxford, U.K.) erkennt eine CD68-ähnliche Struktur, die auf Makrophagen und dendritischen Zellen von Ratten vorkommt (Damoiseaux et al, 1994).

Der verwendete MIF-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Maus-MIF-Protein. Die hohe Homologie zwischen Maus und Ratte ermöglichte die Verwendung dieses Antikörpers in der Rattenspezies. Er wurde freundlicherweise von M. Bacher zur Verfügung gestellt.

Die Antikörper wurden nach dem erstmaligen Auftauen als eine 1 : 10 Verdünnung in PBS mit 1 % BSA, 0,1 %  $\text{NaN}_3$  bei 4 ° C gelagert.

Als Detektionssystem wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode angewandt (Vectastatin-Mouse-IgG-ABC-Kit, Vector Laboratories), welche auf der hohen Affinität von Biotin zu Avidin basiert.

Der Antikörper wurde in der entsprechenden Gebrauchsverdünnung (ED1 1 : 300, MIF 1 : 1000) in PBS mit 1 % BSA, 0,1 % Natriumazid und  $3,3 \times 10^{-4}$  % Avidin eingesetzt und 1 h bei RT auf den hydratisierten Paraffinschnitten inkubiert.

Der ungebundene Antikörper wurde mit PBS entfernt und der biotinylierte Zweitantikörper für 30 min bei RT auf das Präparat gegeben. Im Anschluß daran wurde Peroxidase-markiertes Avidin und Biotin in einer 1 : 100 Verdünnung für 30 min bei RT auf den Schnitten inkubiert. Ungebundene Reagenzien wurden durch Waschen mit TRIS/NaCl (10 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 7,6) entfernt.

Die Detektion der gebundenen Komplexe erfolgte durch Zugabe von Substratlösung (0,5 mg 3',3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma, München pro ml TRIS/NaCl und 0,01 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Es schloß sich eine Hämalaun-Eosin-Färbung an.

### **2.3.3. Hämalaun-Eosin-Färbung**

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine geeignete Methode zur Übersichtsfärbung von Gewebe. Es wurde zur Darstellung der Lungen-Paraffin-Schnitte eingesetzt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der Färbelösung.

<b>HE-Färbelösung</b> (ad 1 l A. dest.)	Hämatoxylin (Blau)	1,0 g
	Natriumjodat	0,2 g
	Kaliumalaun	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	Citrat	1 g

Durch das Hämalalaun werden alle basophilen Zellbestandteile wie z.B. das Chromatin der Zellkerne blau dargestellt. Diese Bläuung stellt sich beim Überspülen der in Farbe getauchten Objektträger mit elektrolythaltigem Leitungswasser ein, dabei bestimmt die Dauer des Wasserkontaktes die Farbintensität. Danach wurde mit Eosin (Rot) gegengefärbt, welches Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rosa darstellt. Die Lösung bestand aus 1 % Eosin-Y, 0,5 ml Eisessig auf 0,1 l A.dest. Die Differenzierung erfolgte in Alkohol.

Die Präparate wurden eingedeckelt und mit einem DMRB Leica-Mikroskop (Bensheim) analysiert.

## **2.4. Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1. Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellsuspensionen**

#### **2.4.1.1. Ethanol-Chloroform-Fällung**

Bei Arbeiten mit RNA muß deren hohe Empfindlichkeit gegenüber ubiquitär vorkommenden RNAsen beachtet werden. Deshalb wird benötigtes Wasser vor dem Autoklavieren mit 0,05 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma, München), einem RNase-Inhibitor, versetzt.

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Lungengewebe und den präparierten Zellsuspensionen wurde der RNA<sup>TM</sup> II Clean Präparationskit (AGS, Heidelberg) nach den Herstellervorgaben verwendet. Nur die Anfangsschritte der Präparation unterschieden sich durch verschieden eingesetzte Ausgangsmengen.

Die bei -80 ° C gelagerte Lunge wurde mittels in flüssigem Stickstoff gekühlten Mörsers und Pistels zerkleinert und sofort mit 3 ml der RNA<sup>TM</sup> II Clean-Lösung vermischt. Dem BAL-Zentrifugat wurde 1 ml der RNA<sup>TM</sup> II Clean-Lösung zugesetzt und der Interstitiellenpräparation wegen der höheren Zellzahl 2 ml.

Diese Lösung führt einerseits zur Zellyse, was über mehrmaliges Scheren der Suspension mit einer Kanüle forciert wurde, und andererseits enthält sie RNase-Inhibitoren, um einem Abbau der RNA während der Präparation vorzubeugen.

Durch Zugabe von einem Teil Chloroform auf 10 Teile der Gesamtlösung, 15 min Inkubation auf Eis und 1 h Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 ° C konnte eine deutliche Phasentrennung erreicht werden. Man erhält drei Schichten, eine RNA-haltige, wäßrige Phase; eine Protein- und DNA-enhaltende Interphase und die Phenol-Chloroform-Phase.

Die oberste, wäßrige Phase wurde abgenommen und die RNA konnte durch Zugabe von der gleichen Menge Isopropanol und Inkubation bei -20 ° C über Nacht gefällt werden. Das bei der Zentrifugation (1 h, 10000 rpm, 4 ° C) entstandene Pellet wurde 3 x mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze weitgehend zu entfernen, dann unter Vakuum getrocknet und in 100 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA wurde bei -80 ° C gelagert.

#### **2.4.1.2. Isolation von mRNA mittels dT-Dynabeads**

Die in Abschnitt 2.4.1.1. gewonnene RNA subsumiert funktionell verschiedenen RNA-Arten, wobei die wichtigsten die ribosomale-(rRNA), die Transfer-(tRNA) und die messenger-RNA (mRNA) sind. Die mRNA macht circa 5 % der gesamten RNA aus und ist charakterisiert durch ihre polyA-Sequenz am 5' Ende.

Diese Eigenschaft wird im Dynabeads mRNA Purification Kit (Dyna, Hamburg) genutzt. Die Isolation der mRNA basiert auf einer selektiven Bindung an Oligo-dT beschichtete, magnetische Partikel (engl. beads). In einem Magnetfeld konnten in den einzelnen Reaktionsschritten die entsprechenden Puffer zur Probe pipettiert oder abgezogen werden, ohne daß die Partikel und damit die daran gebundene mRNA aus dem Röhrchen entfernt wurden. In einem abschließenden Schritt wurde dann die gereinigte mRNA von den Partikeln eluiert.

Die mRNA-Separation wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Die RNA-Präparationen der verschiedenen Tiere wurden über eine photometrische Analyse (siehe Abschnitt 2.4.7.1.) einander angeglichen und 20 µg RNA in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

50 µl der Oligo-dT-Dynabeads wurden in 50 µl Bindungspuffer resuspendiert. Die hitzedenaturierte RNA-Lösung (2 min, 65 ° C) wurde dann für 5min bei RT an die Partikel hybridisiert. Nach zweimaligem Waschen mit 100 µl Waschpuffer konnte durch Zugabe von 20 µl Elutionspuffer und Erhitzen auf 65 ° C für 2 min die mRNA wieder von den Magnetpartikeln getrennt werden. Eine photometrische Kontrolle war wegen der nun sehr geringen noch vorliegenden RNA Mengen nicht möglich. Die Lagerung erfolgte bei -80 ° C.

#### **2.4.2. Herstellung von komplementärer DNA durch Reverse Transkription**

Sollen geringe Mengen mRNA auf die Expression bestimmter Gene untersucht werden, wird die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) genutzt. Diese PCR (siehe Abschnitt 2.4.3.) erfordert als zu untersuchendes Substrat eine DNA-Matrize. Deshalb mußte die mRNA in



komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, welche zudem gegenüber RNasen unempfindlich und somit leichter zu handhaben ist.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe und nach Vorschrift des kommerziellen cDNA-Synthese-Kits (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

Zu 2 µg RNA aus Lungengewebe bzw. 3 µl mRNA-Lösung wurde 1 µl Oligo-dT-Primer (20-mer, 50 pM) zugegeben und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl Volumen aufgefüllt. Diese Lösung (Mix 1) wurde für 10 min bei 72 °C denaturiert.

Der Oligo-dT-Primer und Poly-A-Sequenz der mRNA bilden die notwendige doppelsträngige Ansatzstelle für die Reverse Transkriptase.

Dem Mix 1 wurden folgende Substanzen zugegeben, die, falls nicht anders angegeben, im Kit von Life Technologies enthalten waren (daraus resultiert Mix 2).

<b>Mix 2</b>  pro Ansatz	dNTP (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, (Pharmacia, Uppsala, Schweden)	1 µl
	5x Puffer	4 µl
	0,1 M Dithiothreitol (DTT)	2 µl
	SuperScript II <sup>TM</sup> (200 U/µl)	0,4 µl
	DEPC-H <sub>2</sub> O	1,6 µl

Dieser Mix 2 wurde 50 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die Synthese-Reaktion durch Enzyminaktivierung (15 min, 70 °C) beendet. Die so erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.4.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode wurde in den 80er Jahren von Kary Mullis entwickelt. Er hat damit der Molekulargenetik ein entscheidendes Handwerkszeug geliefert, durch das der Nachweis geringer Mengen von DNA möglich wurde.

An einzelsträngige DNA-Fragmente binden am 3'-Ende spezifische Primer. Diese ca. 20 bp langen Oligonukleotide dienen als Ansatzstelle für die thermostabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus Aquaticus*. Diese Enzym synthetisiert einen komplementären DNA-Strang entlang der vorliegenden

Matrize (Elongation). Danach wird diese DNA bei 94 ° C wieder in Einzelstänge denaturiert, die Primer binden erneut (Annealing) und das Enzym stellt eine nächste Kopie her. Dieser dreistufige Algorithmus ist das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).

Bei jedem Syntheseschritt erfolgt eine Verdopplung der vorliegenden DNA-Matrizen ( $N_0$ =Ausgangsmenge) und damit ein  $N_0 \times 2^n$  Vermehrung bei n Zyklen (Sambrook et al., 1989). Dadurch werden eine geringe Anzahl an DNA-Kopien in einen nachweisbaren Bereich gebracht (Mullis, 1990).

Als Grundlage zur Erstellung der Primer wurden mRNA-Sequenzen genutzt, die in der EMBL-Datenbank (EMBL, Heidelberg) veröffentlicht sind. Bei der Auswahl der Primer-Sequenzen muß u.a. darauf geachtet werden, daß diese etwa gleiche Bindungstemperaturen haben und nur ein Amplifikationsprodukt generiert wird (Ansorge et al., 1993).

### Reaktionsansatz

In ein 0,5 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg) wurden für einen 50 µl-Reaktionsansatz folgende Komponenten pipettiert:

<b>PCR-Ansatz</b>	cDNA-Lösung	1 µl
	10x PCR-Puffer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)	5 µl
	A. dest.	40,8 µl
	Mineralöl (Überschichtung)	50 µl

Diese Substanzen wurden in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid Omnigene, England) für 10 min bei 94 ° C denaturiert (heat soaked-PCR nach Ruano, 1992).

Dann wurden innerhalb von 5 min bei 85 ° C 3,2 µl eines Mixes aus folgenden Reagenzien unter die vor Verdunstung schützende Ölschicht pipettiert.

<b>Mix 2 für PCR</b>  (pro Ansatz)	dNTP (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)			1 µl		
	5´- Primer (50pmol/ml)	synthetisiert von MWG Biotech (Ebersberg)		1 µl		
	3´- Primer (50pmol/ml)			1 µl		
	Ampli Taq® DNA Polymerase			0,2 µl		
	5 U/µl; (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)					

Das Prinzip der PCR basiert auf oben beschriebenem dreistufigen Algorithmus. Die Anzahl der notwendigen Zyklen hängt von der Ausgangsmenge des spezifischen Transkriptes und der gewünschten Signalstärke ab und lag zwischen 25 und 40.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Prinzip
<b>Denaturierung</b>	1 min	94 ° C	ds-DNA wird gespalten und damit die Primerbindung ermöglicht
<b>Primerbindung</b>	30 s	primerspezifisch, siehe Tab. 1	Primer und ss-DNA bilden die ds-Ansatzstelle für die Polymerase
<b>Elongation</b>	1 min	72 ° C	Kettenverlängerung vom Primer aus in 3'- Richtung

Der letzte Elongationsschritt wurde auf 5 min verlängert, um noch verbliebene Einzelstränge durch die Polymerase zu vervollständigen.

Bei der Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O anstelle der cDNA in den Reaktionsansatz pipettiert.

Tab. 1 : Ratten-Primer, PCR-Produktlänge und optimale Annealingtemperatur:

Gen	Primer	Sequenz	PCR-Produkt	° C
GAPDH	sense	5´ - CGT CTT CACCAC CAT GGA GA-3´	300 bp	62
	antisense	5´ - CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3´		
MIF (murin)	sense	5´ - CCTATG TTC ATC GTG AAC AC-3´	284 bp	60
	antisense	5´ - GTT GAT GTA GAC CCG GTC C-3´		
MIP-1 $\alpha$	sense	5´ - CAC CAC TGC CCT TGC TGT TC-3´	200 bp	65
	antisense	5´ - GCC GGT TTC TCT TGG TCA GG-3´		
MIP-2	sense	5´ - GGG TTGTTG TGG CCA CTG AG-3´	332 bp	65
	antisense	5´ - AGG CTT CCT GGG TGC AGT TC-3´		
MCP-1	sense	5´ - CAA TGA GTC GGC TGG AGA AC-3´	284 bp	65
	antisense	5´ - AGT GCT TGA GGTGGT TGT GG-3´		
GRO- $\alpha$	sense	5´ - GGC TTG CCT TGA CCC TGA AG-3´	383 bp	65
	antisense	5´ - CCT TCT TCC CGC TCA ACA CC-3´		
RANTES	sense	5´ - TGC ATC CCT CAC CGT CAT CC-3´	214 bp	65
	antisense	5´ - TGG GTT GGC ACA CAC TTG GC-3´		
iNOS	sense	5´ - TGA CCA TGG AGC ATC CCA AG-3´	414 bp	60
	antisense	5´ - GAG GGA CCA GCC AAA TCC AG -3´		
Plasmid PCR™II	s.(SP6)	5´ - ATT TAG GTG ACA CTACTA TAG-3´	196 bp	60
	as. (T7)	5´ - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3´		

#### **2.4.4. Klonierung eines PCR-Produktes**

Zur Sequenzierung eines PCR-Produktes oder zur Herstellung markierter RNA-Sonden ist es erforderlich, die amplifizierte Sequenz in ein Plasmid, eine ringförmige DNA, zu integrieren. Dieses Plasmid wird dann nach Transformation in Bakterien in hoher Kopienzahl produziert.

Bei der Klonierung von PCR-Produkten macht sich der TA-Kloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA) die Eigenschaft der Taq-Polymerasen zunutze, daß diese nach einer erfolgten Kettenverlängerung an das 3'-Ende der DNA-Stränge eine Adenosinbase anhängen. Dieser Kit wurde in dieser Arbeit zur Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt.

#### **Ligation**

Der Reagenziensatz des TA Cloning<sup>®</sup> Kits beinhaltet ein offenes Plasmid mit 5'-Thymidinüberhängen (pCR<sup>™</sup>II-Vektor), einer Sp6- und T7-Schnittstelle und einer kodierenden Sequenz für Ampicillinresistenz und das lacZ-Gen. Die Basenpaarung von Adenosin mit Thymidin ermöglicht einen richtungsunspezifischen Einbau eines PCR-Produktes in den Vektor.

Zur Insertion des spezifischen PCR-Produktes wurde in 10 µl Gesamtvolumen 1 µl 10 x Ligationspuffer, 50 ng des Vektors, 150 ng PCR-Produkt mit 25 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14 °C inkubiert.

#### **Transformation**

Zur Transformation, also dem Einbringung des Plasmids in speziell vorbehandelte Bakterien, wurde 1 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl der One Shot<sup>™</sup> kompetenten Bakterien (Stamm: INVaF') und 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß daran wurde der Mix für 30 s auf 42 °C erhitzt und dann 2 min auf Eis gekühlt.

Dieser Bakterienansatz wurde zu 450 µl SOC-Nährmedium (Sambrook et al., 1989) gegeben und 1 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad (230 rpm) angezüchtet. Ein Teil der Kultur wurde auf LB-Agarplatten (Luria-Broth; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) ausplattiert, die mit 50 µg/ml Ampizillin und 20 mg/ml

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -Galactosidase; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) beschichtet waren.

Nur wenn die Bakterien ein Plasmid aufgenommen hatten, verfügten sie über die zum Wachstum erforderliche Ampicillinresistenz. Die erfolgreiche Insertion eines PCR-Produktes führte außerdem zu einer Trennung des lacZ-Gens, dessen Translationsprodukt demzufolge nicht mehr zur Umwandlung von X-Gal in ein blaues Reaktionsprodukt zur Verfügung stand.

Nach der Kultivierung über Nacht im 37° C-Wärmeschrank wurden nur die weißen Kolonien in Medium aufgenommen und weiter vermehrt.

#### **2.4.5. Plasmidpräparation**

Um ausreichend Plasmid für die Restriktionsanalyse zur Verfügung zu haben, wurden die selektierten Klone erneut in 5 ml LB-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampizillin über Nacht bis zu einer optischen Dichte von max. 1,5 bei 600 nm kultiviert und durch Zentrifugation bei 800 x g pelletiert.

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mengenabhängig der Quiagen Plasmid Mini bzw. Midi Kit (Qiagen, Hilden) angewandt. Die Präparation wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt und beginnt mit einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien.

Nach Zentrifugation der Bakterienkultur wurde das Zellpellet in Puffer 1 resuspendiert und mit gleiche Teilen Puffer 2 vermischt. Nach Inkubation für 5 min bei RT wurden ein gleiches Volumen Puffer 3 zugegeben und die resultierende zähflüssige Lösung für 30 min bei 4 ° C und 15000x g zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun das frei gewordene Plasmid, das unter Niedrigsalzbedingungen an eine Anionenaustauschersäule gebunden wurde. Diese Säulen wurden zuvor mit QBT-Puffer äquilibriert.

Verunreinigungen wurden mit QC-Puffer von der Säule gewaschen. Letztlich wurde die Plasmid-DNA mit einem Hochsalzpuffer (QF-Puffer) von der Säule eluiert. Dann erfolgte eine Fällung der DNA durch Isopropanol (Eluat : Isopropanol = 1 : 0,7). Nach Zentrifugation mit 15000 x g bei RT für 30 min wurde das DNA-Pellet in 70 % Ethanol salzfrei gewaschen. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

## **Restriktionsanalyse**

Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. Das Enzym schneidet auf beiden Seiten der Insertionsstelle.

Dazu wurden ca. 2 µg des Plasmids mit dem mitgelieferten 5x Restriktionspuffer III und 3 U EcoRI (Pharmacia, Uppsala, Schweden) für 2 h bei 37 °C verdaut. Das Produkt wurde, wie unter 2.4.7.2. beschrieben, im Agarosegel analysiert.

Von Klonen mit Insert wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 4 ml der Bakteriensuspension 1 ml Glycerin zugesetzt wurde und diese dadurch bei -20 °C lagerbar wurden.

### **2.4.6. DIG-Markierung von Nukleinsäuren**

Das Digoxigenin (DIG) ist ein abgewandeltes Steroid aus Digitalispflanzen (Fingerhut, *Digitalis purpurea* bzw. *lanata*). Es kann an den Pyrimidinring des Uridin-Nukleotids stabil gebunden und als DIG-dUTP in einen DNA- bzw. RNA-Strang eingebaut werden.

Daraus resultieren prinzipiell zwei Möglichkeiten, DNA oder auch RNA mit DIG zu markieren.

Erstens kann bei der Synthese eines DNA-oder RNA-Komplementärstranges z.B. über eine PCR oder eine Plasmidtranskription eine Nukleotidgemisch verwendet werden, das anteilig DIG-markierte Nukleotide enthält (siehe Abschnitt DIG-DNA Sonden).

Alternativ dazu können Primer, die als Ansatzstelle für Enzyme fungieren, DIG-markiert sein (siehe Sequenzierreaktion).

Ein indirekter Nachweis von DNA oder RNA ist dann durch Bindung an komplementäre markierte Sonden möglich (siehe Dot Blot und Northern Blot).

Die Nachweisverfahren werden in Abschnitt 2.4.7. beschrieben.

#### **2.4.6.1. Herstellen DIG-markierter DNA-Sonden**

Das Grundprinzip der Sonden Herstellung ist die Durchführung einer PCR, die in Abschnitt 2.4.3. beschrieben wird.

Zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden wurden dem Reaktionsansatz zusätzlich 0,25 mM DIG-dUTP (Boehringer Mannheim) zugesetzt, das alternativ zu Thymidin in die DNA eingebaut wurde. Dadurch enthielt das resultierende PCR-Produkt DIG-Moleküle.

Die DIG-markierten PCR-Produkte wurden mit dem Wizard™ PCR Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) strikt nach dem Herstellerprotokoll gereinigt, um kleine Fragmente und ungebundene Primer und Nukleotide zu entfernen.

#### **2.4.6.2. Herstellen DIG-markierter RNA-Sonden**

Markierte RNA kann durch in vitro-Transkription von DNA synthetisiert werden. Dazu mußte ein Abschnitt des zu untersuchenden Gens, wie unter 2.4.4. beschrieben, in ein Plasmid einkloniert werden. Bakterien wurden dann damit transformiert und bei erfolgreicher Insertion aus ihnen nach Vermehrung das Plasmid isoliert.

Zur Sondenherstellung verwendet man Plasmide, die Sp6-oder T7-Promotoren tragen. Diese Promotorregionen fungieren als Bindungsstelle für Sp6-bzw. T7-RNA-Polymerasen, die eine RNA-Kopie in 3'-Richtung durch in vitro-Transkription synthetisieren. Vor der Synthese müssen die Plasmide durch Restriktionsenzyme linearisiert werden. Werden DIG-markierte Uridintriphosphate zu der Reaktion zugegeben, so wird statistisch jedes 20. - 25. Nukleotid der synthetisierten RNA ein DIG-UTP sein. Unter Standardbedingungen lassen sich aus 1 µg Template-DNA etwa 10 µg DIG-markierte RNA transkribieren.

#### **Restriktionsverdau der Plasmide**

Restriktionsenzyme sind in Prokaryonten vorkommende Enzyme, welche den DNA-Doppelstrang an durch bestimmte Nukleotidabfolge charakterisierten Stellen spalten können. Diese Eigenschaft nutzt man, um bei der in vitro-Transkription Fragmente mit begrenzter Länge zu synthetisieren. Dazu wird das Plasmid auf der Seite des Inserts geschnitten, die der Promotorregion gegenüber liegt.



Dazu wurden 20 µl Plasmid der Minipräparation in 59 µl A. dest. aufgenommen, mit 20 µl 10x Restriktionspuffer III und 1 µl Restriktionsenzym (5 U/µl) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Restriktionsenzyme wurden BamH1 bzw. XhoI verwendet.

Anschließend wurde das linearisierte Plasmid durch Ethanolpräzipitation gefällt. Dazu wurden 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 200 µl Ethanol (96 %) zum Restriktionsverdau zugegeben. Die Fällung erfolgte bei -20 °C über Nacht. Der Ansatz wurde zentrifugiert und das Präzipitat in Ethanol (70 %) gewaschen. Das Pellet wurde dann unter Vakuumsog getrocknet und in 50 µl A. dest. gelöst. Zur Kontrolle der Linearisierung wurde das Plasmid gelelektrophoretisch getrennt. Es wird durch seine veränderte Konformation schlechter als das unverdaute, supercoiled vorliegende Plasmid aufgetrennt. Die Menge des linearisierten Plasmids kann durch Vergleich mit der Bandenintensität des Markers  $\lambda$  HIND-III-Verdau (USB) abgeschätzt werden.

### In vitro-Transkription

Zur Synthese von RNA-Kopien anhand der linearisierten DNA wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt, der 2 h bei 37 °C inkubiert wurde.

<b>Transkriptions- ansatz</b>	linearisierte Plasmid-DNA	1 µg
	10x Transkriptionspuffer (Kit)	2 µl
	dNTP-Markierungsgemisch (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 1mM DIG-dUTP)	2 µl
	Sp6-Polymerase bzw. nach Verdau mit XhoI	2 µl
	T7-Polymerase bzw. mit BamH I	2 µl
	A. dest.	20 µl

Die Synthese wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8,0) abgestoppt. Die markierte RNA wurde dann durch Zugabe von 2,4 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl kaltem Ethanol und Inkubation über 2h bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wurde 1h bei 12000 g zentrifugiert und das so erhaltene Präzipitat mit 50 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Nach Trocknen unter Vakuum wurde die RNA bei

37 °C über 20 min in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Der Erfolg der in vitro-Transkription wurde durch RNA-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung oder durch Northern-Blot mit direktem DIG-Nachweis kontrolliert.

## **2.4.7. Nachweis von Nukleinsäuren**

### **2.4.7.1. Spektrophotometrische Messung**

Nachweis und Quantifizieren von Nukleinsäuren ist photometrisch möglich. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Proteine, ermöglicht über den Quotienten der Werte bei 260/280 nm eine Aussage über den Reinheitsgrad der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Eine optische Dichte von "1" in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA und 33 µg/ml Oligonukleotiden.

### **2.4.7.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren werden in einer festen Trägersubstanz, wie z.B. Agarose oder Polyacrylamid einem elektrischen Feld ausgesetzt und in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladungseigenschaften aufgetrennt.

#### **2.4.7.2.1. DNA-Gele**

Zur Analyse von linearer (PCR-Produkt) oder ringförmiger (Plasmid) DNA können horizontale Agarosegele (1,0 -1,5 %) genutzt werden.

Agarose (BRL, Gaithersburg) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Kochen gelöst und in die Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x TAE als Laufpuffer gefüllt, bis das Gel vollständig von Puffer bedeckt war.

10 µl der DNA-Probe wurden mit 2 µl Farbmaler versetzt und bei einer Spannung von 4 V pro cm Gellänge getrennt. Als Größenstandard wurde ein 100 bp Marker (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mitgeführt.

Der Nachweis erfolgte über Ethidiumbromid, das sich an helikale DNA-Strukturen anlagert und mittels UV-Licht visualisiert werden kann. Dazu wurden die DNA-Gele für 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt, das 0,25 % EtBr in einer 1 : 1000 Verdünnung in A. dest. enthält.

<b>50 x TAE-Puffer</b> ad 1 l A.dest.	TRIS-base	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (pH 8,0, 0,5 M)	100 ml

<b>6 x Farbmarker</b> ad 100 ml A.dest.	Bromphenolblau	0,25 ml
	Xylencyanol	0,25 ml
	Glycerin	30 ml

Die Dokumentation und Auswertung der DNA Gele wurde unter 2.5.1. beschrieben.

#### 2.4.7.2.2. RNA-Gele

Bei der Auftrennung von RNA muß das Gel denaturierende Eigenschaften aufweisen, um ein Aneinanderlagern der Einzelstränge zu verhindern.

Vor der Elektrophorese müssen die Gelkammern mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min inkubiert und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült werden, um Kontaminationen mit RNasen zu eliminieren.

In 1 x MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) wurde eine 1 % Agaroselösung hergestellt, der nach Abkühlen auf 50 ° C 5% Formaldehyd (37 %, pH 3,4) zugesetzt wurde.

7,5 µl der RNA-Proben wurden mit 2,5 µl Probenscocktail gemischt und 10 min bei 65 ° C denaturiert.

Als Laufpuffer diente 1 x MOPS. Der Probeneinlauf erfolgte submer bei einer Stromstärke von 100 mA, dann wurde der Puffer aufgefüllt bis das Gel bedeckt war. Die Elektrophorese wurde mit 40 mA weitergeführt.

Die Färbung erfolgte ebenfalls mit Ethidiumbromid, was jedoch eine weniger stabile Wechselwirkung mit der einzelsträngigen RNA eingeht als mit DNA. Aus

diesem Grund erfolgte die Färbung für 30 min in Ethidiumbromid (EtBr 1 : 1000 in 0,1 M Ammoniumacetat). Anschließend wurde unspezifischer Hintergrundfärbung durch Inkubieren des Gels für 1 h in 0,1 M Ammoniumacetat entfernt.

<b>10 x MOPS</b>	4-Morpholinopropansulfon- säure(0,2 M)	41,8 g
pH 7,0	Natriumacetat (50 mM)	4,1 g
(dunkel lagern)	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	20 ml
ad 1 l A. dest.		

<b>Probencocktail</b>	10 x MOPS	150 ml
(portioniert bei	Formamid	750 ml
-20 ° C gelagert)	Formaldehyd	240 ml
	Glycerin	100 ml
	Bromphenolblau (1 %)	80 ml
	A.dest.	100 ml

<b>RNA-Färbegrad</b>	Ammoniumacetat (0,1 M)	400 ml
	Ethidiumbromidlsg. (0,25 %)	0,4 ml
<b>Entfärbung</b>	Ammoniumacetat (0,1 M)	400 ml

Das Gel zeigt nach der EtBr-Färbung lediglich die in großen Mengen auftretenden 28sRNA (= 4718 Nukleotide) und 18sRNA (= 1874 Nukleotide). Möchte man spezifische mRNA nachweisen, muß die RNA auf eine feste Phase gebunden werden (Northern Blot siehe 2.4.7.3.2.), um sie anschließend selektiv über hybridisierende Sonden nachweisen zu können.

### 2.4.7.3. Blotten

Neben der gelelektrophoretischen Auftrennung gibt es die Möglichkeit, DNA, RNA oder auch Protein an ein festes Trägermedium, z.B. eine Membran, zu

binden und dann ein Nachweisverfahren anzuschließen. Diese Aufbringen auf eine Membran nennt man Blotten.

#### **2.4.7.3.1. Nachweis von PCR-Produkten durch Dot-Blot**

Wird elektrophoretisch getrennte DNA von einem Gel auf eine Membran transferiert, spricht man von Southern Blot. Erfolgt das Aufbringen von DNA auf eine Membran in Form von Tropfen ohne vorherige Auftrennung durch Gelelektrophorese, handelt es sich um einen Dot-Blot. Dot-Blots wurden angewandt, um bei einigen PCRs die Synthese exakter quantifiziert zu können, als es durch Ethidiumbromid-Färbung von Gelen möglich ist. Außerdem sollte sicher dokumentiert werden, daß die Analyse im exponentiell ansteigenden Bereich der PCR-Reaktion erfolgte.

Die PCR-Endprodukte wurden zusätzlich zum Dot-Blot-Nachweis außerdem in der Gelelektrophorese untersucht, um die richtige Produktlänge und die Reinheit der Probe zu dokumentieren.

#### **Probengewinnung**

Dazu wurden 10, 8, 6, 4, und 2 Zyklen vor Abschluß der PCR je 4 µl PCR-Ansatz in 200 µl 10 x SSC aufgenommen. Für jeden PCR-Ansatz erhielt man so 5 Proben, die unterschiedliche Amplifikationsraten repräsentierten. 100 µl dieser Proben wurden unter Verwendung einer Blot-Apparatur nach einem standardisiertem Schema pipettiert und mittels Unterdruck auf eine Nylonmembran (positively charged, Boehringer Mannheim) geblottet.

Die getrocknete Membran wurde mit UV-Licht (1,24 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt (Fluo-Link, Biometra, Göttingen) und dadurch eine kovalente Bindung negativer Reste der DNA mit positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran erreicht (Church und Gilbert, 1984).

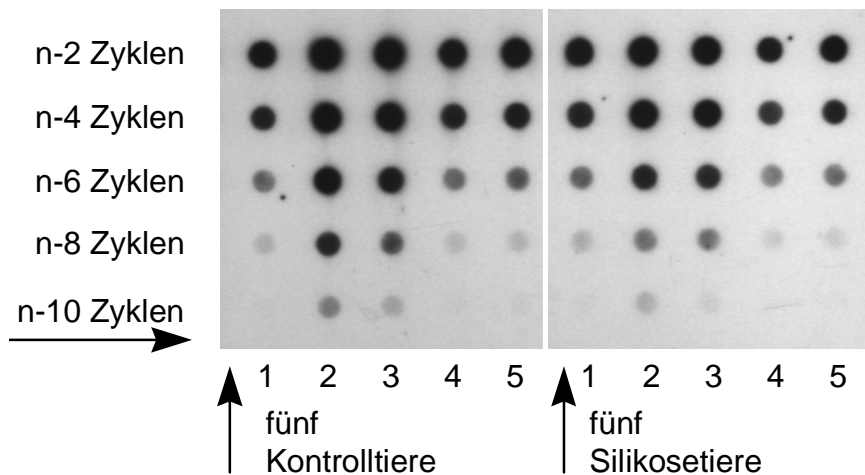


Abb. 1: Pipettierschema der Dot Blots. In den vertikalen Spuren sieht man den Auftrag der Proben aus jeweils einem PCR-Ansatz zu verschiedenen, von unten nach oben zunehmenden Zyklenzahlen ( $n$  = Endanzahl der Syntheszyklen).

### Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden

Um die membrangebundene DNA nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde an sie DIG-markierte, spezifische DNA-Sonde hybridisiert.

Die Membran wurde 5 min in 0,04 M NaOH alkalisiert, um Doppelstrang-DNA zu denaturieren und dann 2x 2 min in 2x SSC gespült. Anschließend wurde sie in eine trennende Nylongaze eingerollt und in Glasröhren im Hybridisierungssofen für 1 h bei 68 °C mit 10 ml Hybridisierungspuffer vorbehandelt (Prähybridisierung).

<b>20x SSC (pH 7,0)</b>	NaCl	175,3 g
Ad 1 l A. dest.	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	88,2 g

<b>Hybridisierungspuffer</b>	SSC (20x)	12,5 ml
(bei -20° C lagern)	N-Lauroylsarkosin (10 %)	5 ml
	SDS (20 %)	0,05 ml
	A. dest.	32,45 ml

Danach erfolgte die Hybridisierung, indem durch 10 minütiges Kochen denaturierte, DIG-markierte DNA-Sonde (10 ng pro ml Hybridisierungspuffer) zugesetzt wurde. Dieser Hybridisierungsansatz wurde bei 68 °C über Nacht unter ständiger Rotation auf der Membran inkubiert. Die hybridisierten Membranen wurden 3 x 10 min in Waschlösung I und anschließend 2 x 15 min in Waschlösung II bei 68 °C gewaschen.

<b>Waschlösung I</b> (ad 500 ml A. dest)	SSC (2x)	50 ml
	SDS (0,1 %)	2,5 ml
<b>Waschlösung II</b> (ad 500 ml A. dest)	SSC (0,1x)	2,5 ml
	SDS (0,1 %)	2,5 ml

Anschließend erfolgte der DIG-Nachweis, wie unter 2.4.9. beschrieben.

#### 2.4.7.3.2. Northern Blot

Im Northern Blot wird elektrophoretisch aufgetrennte RNA auf eine Membran transferiert und fixiert. Durch Hybridisierung mit RNA-Sonden kann mRNA spezifisch nachgewiesen werden.

Für den Blottvorgang bedient man sich der Kapillar-Transfer-Methode, einem osmotisch entstehendem Flüssigkeitsfluß, der RNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran transportiert.

Bevor der im folgenden beschriebene Versuchsaufbau genutzt wird, muß das Gel und die Membran vorbehandelt werden. Die Nylonmembran (Boehringer Ingelheim) wird 15 min in A. dest angefeuchtet und anschließend mindestens 15 min in 20x SSC äquilibriert. Das Gel wird 3x 20 min in A. dest. gespült, um das Formaldehyd zu entfernen und dann in 20x SSC bis zum Einbringen in die Blot-Vorrichtung gelagert.

Die Basis dieses Blot-Aufbaus bildet ein auf einem Sockel liegendes Blatt Whatman-Papier (Gel-Blotting-Papier von Schleicher und Schuell), das über herabhängende Enden 20x SSC aus einem Reservoir ziehen kann. Darauf werden 4 Blatt in 20x SSC eingeweichte Whatman-Papier gelegt, um eine ebene Auflagefläche für das elektrophoretisch getrennt Gel zu erhalten. Direkt

auf das nun folgende Gel wird die Membran aufgelegt. Darüber stapelt man 5 Blatt in 20x SSC eingeweichtes Whatman-Papier und noch mehrere Lagen Zellstofftücher, die abschließend mit einer Platte beschwert werden. Durch diesen Versuchsaufbau entsteht ein Flüssigkeitssog entgegen der Schwerkraft, der die RNA aus dem Gel in die darüber liegende Membran befördert. Dazu wird diese Vorrichtung über Nacht bei 4 ° C inkubiert. Danach wird die Membran luftgetrocknet und die RNA durch Bestrahlung mit 1,25 J/cm<sup>2</sup> UV-Licht kovalent daran gebunden. Bis zur Hybridisierung kann die Membran in Folie eingeschweißt bei -20 ° C gelagert werden.

### Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden

Die Northern-Blot-Membranen wurden 5 min in 0,04 N NaOH alkalisiert und 2x 2 min in 2x SSC neutralisiert. Sie wurden in angefeuchtete Nylongaze eingerollt und in Hybridisierungsflaschen überführt. Es erfolgte die Prähybridisierung bei 68 ° C über 60 bis 120 min mit folgenden Mix.

<b>Prähybridisierungs- mix</b> (bei -20° C lagern)	Formamid	50 ml
	20x SSC	25 ml
	Blocking-Reagenz (10 %)	20 ml
	N-Laurylsarcosin (10 %)	1 ml
	SDS (20 %)	100 µl
	A. dest.	3,9 ml
	Lachssperm-DNA (denaturiert, unmittelbar vor Verwendung zugeben)	100 µl auf 5 ml Mix

Für die Hybridisierung wird die spezifische DIG-markierten RNA-Sonde in diesem Prähybridisierungsmix in einer Konzentration von ca. 50 ng/ml aufgenommen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 ° C. Hybridisierte Membranen wurden im Anschluß 3x 10 min mit Waschlösung I und im Anschluß 2x 15 min in Waschlösung II bei 68 ° C gewaschen. An diese Hybridisierung schloß sich die Detektion der DIG-Moleküle mittels Chemilumineszenz (2.4.9.) an.



### 2.4.8. Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger et al.(1977) angewandt. Ein linearisiertes Plasmid mit zu analysierendem Insert dient als Matrize zur Synthese dazu komplementärer Stränge. Dem Reaktionsansatz werden Didesoxynukleotide zugesetzt, wobei für jedes Nukleotid eine separate Reaktion durchgeführt wird. Der statistisch zufällige enzymatische Einbau des Didesoxynukleotids anstelle eines natürlichen Desoxynukleotids bewirkt einen Synthesestop (Kettenabbruch) an der entsprechenden Basenposition, wodurch viele verschieden lange Kopien entstehen.

Über die Direct-Blotting-Electrophoresis Methode und die sich anschließende immunologische Detektion der DIG-markierten Produkte konnte aus der Verteilung der aufgetrennten Kettenlängen auf die Position der Nukleotide geschlossen werden.

Die Apparatur, die Gel-und Pufferreagenzien und die Membran wurden von der Firma GATC (Konstanz) bezogen.

#### 2.4.8.1. Vorbereitung der DNA

##### Denaturierung des ds-Plasmids

Für die Sequenzierreaktion wird Einzelstrang DNA als Matrize benötigt. Deshalb wurde zunächst eine Denaturierung der DNA nach dem GATC-Herstellerprotokoll durchgeführt (nach Tabor et al, 1990).

Zur Denaturierung wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 7 µg DNA in 32 µl TE-Puffer mit 4 µl 2 M NaOH versetzt und für 10 min bei RT inkubiert, um Wasserstoffbrückenbindungen zu stören.

<b>TE-Puffer</b>	TRIS (1M, pH 8,0)	20 ml
ad 1 l A. dest.	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 ml

Durch Zugabe von 18 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 120 µl 96 % Ethanol und 15 min Aufbewahrung bei -80 °C wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation (5 min, 12000 g) wurde das Pellet mit 150 µl 70 % Ethanol zur Entfernung der

Salze gewaschen. Es wurde luftgetrocknet, in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 2 min vor der Sequenasereaktion in 7 µl A. dest. gelöst.

### Sequenzierreaktion

Es wurde der „Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit“ (USB, Cleveland, Ohio, USA) eingesetzt und nach dessen Vorschrift vorgegangen.

Bei der **Annealing-Reaktion** soll an das linearisierte Plasmid ein plasmidspezifischer Primer, in dieser Arbeit also entweder Sp6-oder T7-Primer, binden. Dazu wurde die denaturierte DNA mit 2 µl 5 x Sequenasepuffer und 1 µl Primer (DIG-markiert, 1 pmol) für 2 min auf 65 ° C erhitzt, anschließend über einen Zeitraum von 30 min auf 35 ° C abgekühlt, kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert.

<b>Sequenasepuffer</b> (5 x Konzentrat)	Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	NaCl	250 mM

Für jedes Nukleotid enthält der Kit einen separaten **Terminationsansatz**, der neben 50 mM NaCl alle Nukleotide (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) in einer Konzentration von 80 µM und jeweils ein Nukleotid in seiner Didesoxyform in einer Konzentration von 8 µM enthält. Je 2,5 µl dieser vier Terminationsansätze wurden 1 min auf 37 ° C vorgewärmt.

Die Sequenase-Polymerase (13 U / ml) wurde 1 : 8 in Dilutionspuffer verdünnt.

<b>Dilutionspuffer</b> (Kit)	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	DTT	5 mM
	BSA	0,5 mg / ml

Zur eisgekühlten Annealing-Lösung wurden 1 µl 0,1 M DTT und 2 µl der frisch verdünnten Sequenase gegeben. Davon wurden je 3 µl zu den verschiedenen Terminationsansätze gegeben und alles bei 37 ° C für exakt 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stopplösung beendet.

<b>Stopplösung</b> (Kit)	Formamid	95 % (v/v)
	EDTA	20 mM
	Bromphenolblau	0,05 %
	Xylencyanol FF	0,05 %

Bis zum Auftrag auf das Sequenziergel konnten die Proben bei -20 ° C gelagert werden (max. 2 Wochen).

#### 2.4.8.2. Sequenzanalyse

Eine entscheidende Anforderung an die Gelelektrophorese zur Sequenzierung von DNA ist die hohe Trennschärfe. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 0,19 mm dünnen Polyacrylamid-Vertikalgel, das zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde.

#### Glasplattenvorbereitung

Auf die gründlich gereinigten Glasplatten wurde 600 µl Silanlösung mit einem Ethanol-getränkten Tuch aufgebracht. Das überschüssige Silan wurde nach ca. 15 min mit einem Ethanol-Wischtuch entfernt.

<b>Silanlösung</b>	Silan	50 ml
	Essigsäure (100 %)	30 ml
	A. dest.	300 ml
	Ethanol (96 %)	9,62 ml

#### Herstellung des Geles

Es wurde ein denaturierendes Harnstoffgel hergestellt. Dazu mußten 10 x TBE und Harnstoff-Diluent als Stammlösungen hergestellt werden. Die 30 % Gellösung und die Polymerisationsstarter TEMED und APS wurden als Fertiglösung von der Firma GATC bezogen.

<b>10 x TBE</b>	Tris	154,5 g
	Borsäure	26,2 g

	Na <sub>2</sub> -EDTA	9 g
	A. dest.	810 g

<b>Harnstoff-Diluent</b>	Harnstoff	84 g
	10x TBE	18,7 g
	A. dest.	73,4 g

<b>Gellösung, 4 %</b>	GATC-Gellösung, 30 %	3,35 ml
	Harnstoff-Diluent	21,65 ml

<b>Gellösung, 30 %</b> (GATC-Kit)	Acrylamid (w/v)	30 %
	Bisacralamid (w/v)	0,8 %

Die 4%ige Gellösung wurde durch Filterpapier gefiltert, 5 min durch Unterdruck entgast und dann gewogen. Zu 24 mg Gel mußten genau 20 µl TEMED und 66,7 µl APS dazugegeben werden. Mit Hilfe einer Spritze wurde das Gel luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen und diese fest an den Gießtisch gedrückt, um eine glatte untere Gelkante zu erhalten. Der Vorkamm wurde am oberen Ende 2 -3 mm tief in das Gel geschoben. Nach 1 h wurden vom Austrocknen gefährdete Regionen mit 1 x TBE benetzt. Nach 2 h war das Gel vollständig polymerisiert.

## Elektrophorese

In das untere Pufferreservoir wurden 850 ml entgaster 1 x TBE-Puffer gefüllt und das Gel in die Apparatur eingesetzt. Die obere Kammer wurde mit 500 ml 1x TBE gefüllt. Der Vorkamm wurde entfernt und die dadurch entstehende Tasche gründlich gespült. Die Vorelektrophorese erfolgte bei 1400 V (ca. 16 mA) für 30 -45 min.

Die Geltasche wurde erneut gespült und der Haifischkamm etwa 0,2 mm tief in das Gel eingestochen. In die so erzeugten Kammern wurden dann 1,5 µl der zuvor für 10 min bei 70 ° Cdenaturierten Proben pipettiert.

Der Einlauf in das Gel erfolgte mit 300 V (ca. 3 mA) für 10 min, bevor die Spannung auf 1750 V (ca. 17 mA) erhöht wurde.

Sobald die Farbmarkerfront die untere Gelkante erreicht hatte, wurde die Membran (ca. 40 cm) auf das Förderband geklebt und unter die Gelkante transportiert. Synchron zur weiteren elektrophoretischen Probenauftrennung wurde die Membran mit 19 cm/h befördert und die DNA direkt auf die Membran geblottet.

Die Membran wurde getrocknet und die darauf gebundene DNA mit 1,24 kJ/cm<sup>2</sup> UV-Bestrahlung fixiert. Nun schloß sich der Farbnachweis der DIG-markierten DNA an (siehe Abschnitt 2.4.9.).

Die Basenabfolge wurde dann mittels des Computerprogramms Husar in Heidelberg auf Homologie mit bekannten Sequenzen untersucht.

#### 2.4.9. Nachweis DIG-markierter DNA

Die Detektion DIG-markierter DNA kann über Alkalische-Phosphatase konjugierte Anti-DIG-Antikörper (Fab-Fragmente) (Boehringer Mannheim) und die anschließende Visualisierung durch Chemilumineszenz (Höltke et al., 1992) oder Farbnachweis mit Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) und 5-Brom-4-Indolylphosphat-Toluidin-Salz (X-Phosphat) (Seibl et al., 1990).

In dieser Arbeit wurde die Nachweismethode über DIG-Markierung von DNA bei der Sequenzierung und dem Dot Blot angewandt.

##### 2.4.9.1. Immundetektion

Die Membranen des Direkt-Sequenzierblottes und der hybridisierten Dot Blots wurden zunächst für 5 min in A. dest. gespült und dann in 100 ml Maleinsäurepuffer äquilibriert.

<b>Maleinsäure-Puffer,</b> pH 7,5, ad 2 l	Maleinsäure	23,21 g
	NaCl	17,53 g
	NaOH	16,06 g

Durch Inkubieren der Membran in 2 % Blocking-Puffer für 30 -60 min wurden unspezifische Bindungsstellen neutralisiert. Der 2 % Blocking-Puffer wurde durch Verdünnen einer 10x Stammlösung in Maleinsäure-Puffer hergestellt.

<b>10x Blocking-Puffer,</b> pH 7,5, autoklaviert bei 4 ° C lagern	Blocking-Reagenz	10 g (w/v)
	Maleinsäure-Puffer	90 g (v/v)

Dann erfolgte die eigentliche Immundetektion. Dazu wurden 3 µl Anti-DIG-Antikörper (F<sub>ab</sub>-Fragmente, Alkalische-Phosphatase konjugiert, Boehringer Mannheim) in 15 ml Blocking Puffer aufgenommen und 60 min auf der Membran inkubiert. Nach 3x 15 min Waschen mit 150 ml Maleinsäure-Puffer ist auf der Oberfläche der Membran eine mit der Menge an DIG-markierter DNA direkt korrelierende Menge Alkalischer Phosphatase gebunden.

Die Nachweisreaktionen über Farbdetektion bzw. Chemilumineszenz erfolgen im alkalischen Milieu. Die Membranen wurden deshalb 5 min in 150 ml Reaktionspuffer äquilibriert.

<b>Reaktionspuffer</b> pH 9,5, ad 1 l	NaCl	5,84 g
	MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	10,02 g
	Tris/HCl	0,83 g
	Tris-Base (pH 9,5)	11,58 g

#### 2.4.9.2. Farbnachweis

Der Farbnachweis wurde nach einem Protokoll und mit den Reagenzien von Boehringer Mannheim durchgeführt.

67 µl Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) und 52 µl 5-Brom-4-Indolylphosphat-Toluidin-Salz (X-Phosphat) wurden in 15 ml Reaktionspuffer gelöst. Dieses Substratgemisch wurde 3 -24 h bei RT im Dunkeln mit der Membran inkubiert. In Abhängigkeit von der Signalstärke wird in dieser Zeit ein bläulicher Farbton sichtbar.

Bei ausreichender Signalstärke wurde die Membran 15 min in 150 ml H<sub>2</sub>O und 15 min in 150 ml TE-Puffer gewaschen. Sie wurde getrocknet und zur besseren Farbfixierung für 20 min bei 80 ° C inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde sie mit dem Auswertungsprogramm „BioProfil“ dokumentiert.

#### **2.4.9.3. Chemilumineszenz**

Alternativ zu Farbstoffen kann die an Antikörper-gebundene Alkalische Phosphatase auch chemilumineszente Substanzen umsetzen. Bei Chemilumineszenz-Substraten für alkalische Phosphatase handelt es sich um Verbindungen, die nach enzymatischer Dephosphorylierung instabil werden und unter Lichtemission zerfallen. Die Intensität des Lichtsignals ist dabei direkt proportional zur Menge des anti-DIG-AK-gekoppelten Enzyms und damit zur DIG-markierten DNA.

Nach der oben beschriebenen Immundetektion wurde die Membran 5 min in Reaktionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde sie 5 min mit frisch gefilterter Substratlösung CDP-Star (Tropix, Bedford, Massachusetts, USA) im Dunkeln bei RT inkubiert, in Plastikfolie eingeschweißt und noch weitere 15 min bei 37 °C gelagert.

Die Emission des Lichtsignals wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Hyper-Film, Amersham, Braunschweig) dargestellt und dokumentiert. Zur Entwicklung des Filmes wurden Fotochemikalien von Agfa-Gefaert (Entwickler: G152, Fixierer: G 354) verwendet.

Die Quantifizierung erfolgte analog zu den Auswertungen der DNA-Gele unter Verwendung der Software „BioProfil“ und „BIO1D“.

## 2.5. Auswertung und statistische Methoden

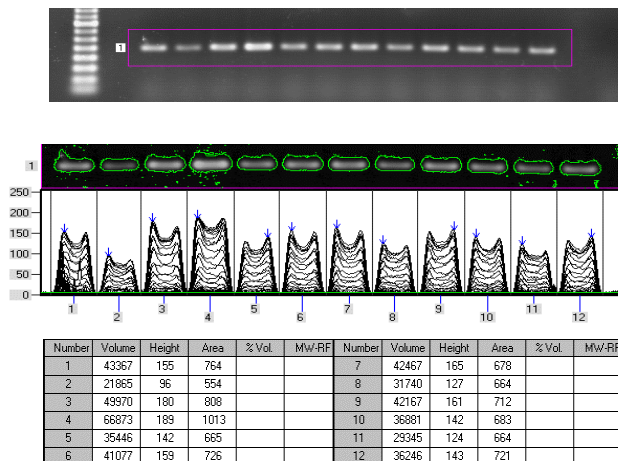
### 2.5.1. Auswertung von DNA Gelen und Blots

Zur Dokumentation und quantitativen Auswertung der Ethidiumbromid gefärbten Gele, der Dot Blots und der Northern Blots diente das Gelanalyse-System „BioProfil<sup>®</sup>“ (VILBERT LOURMANT, Marne La Vallee, Frankreich).

Mit Ethidiumbromid gefärbte Gele wurden auf einem UV-Licht Transilluminator ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) mit einer CCD-Kamera fotografiert und in digitalisierter Form im gekoppelten Personalcomputer gespeichert.

Die Filme der Northern Blot und der DNA-Dot Blots wurden unter Durchleuchtung mit sichtbarem Licht fotografiert.

Die Software „BIO1D<sup>®</sup>“ (VILBERT LOURMANT, Marne La Vallee, Frankreich) ermöglichte die weitere Auswertung, so daß eine Umrechnung der Banden-Intensität in optische Dichte (Volumes) möglich wurde. Dieser Auswertungsvorgang wird in Abbildung 2 anhand eines DNA-Agarose-Geles veranschaulicht.



fotografiertes Gel mit Definition des auszuwertenden Bereiches

analysierter Gelausschnitt mit Grafik der Bandenintensität

Angabe der Bandenintensität in numerischen Werten (Volume = optische Dichte)

Abb. 2: Ermittlung der optischen Dichte der Banden eines Gelabschnittes



### **2.5.2. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der numerischen Daten, also der optischen Dichten, erfolgte auf einem Personalcomputer unter Anwendung des Statistikprogramms „SigmaStat“. Die grafische Darstellung wurde mit „SigmaPlot“ vorgenommen (Jandel Scientific, Corte Madera, USA). Zur Feststellung der statistischen Signifikanz von Unterschieden zwischen verschiedenen Gruppen wurde der t-Test nach Student nach vorangegangener Überprüfung der Stichproben auf Normalverteilung eingesetzt. Alle Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant eingestuft.

### 3. ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit beschreibt Veränderungen in der Lunge bei Erkrankung an Silikose anhand eines Tiermodelles. Es wurden Ratten 12 Monate nach einer 8-tägigen Inhalation von  $\alpha$ -Christobalit, also im chronischem Stadium der Silikose, präpariert. Lungengewebe und einzelne Zellsubpopulationen wurden auf ihre Genexpression immunregulatorischer Botenstoffe im Vergleich zu einer nicht exponierten Kontrollgruppe analysiert.

#### 3.1. Histologie der Lunge nach Inhalation von $\alpha$ -Christobalit

Die in dieser Arbeit angewandte Inhalationsexposition von Ratten gegenüber Christobalit ist eine etablierte Methode, die zur Ausprägung der chronischen, unkomplizierten Silikose mit ihren charakteristischen, histologischen Veränderungen führt. Dazu zählen eine milde ausgeprägten Bindegewebsvermehrung (Fibrosierung), die sich in Verdickung der Septen äußert und die Ausbildung silikotischer Knötchen.

In den Abbildungen 3a und 3b (freundlicherweise von A. Friedetzky zur Verfügung gestellt) sieht man die histologische Aufarbeitung von Lungengewebe in kleiner Vergrößerung. Man sieht in dem Schnitt durch die Lunge des erkrankten Tieres (3a) verbreiterte Alveolarsepten und lokale Akkumulationen von Zellen, die silikotischen Knoten, während Abbildung 3b normales Lungenparenchym aufzeigt. Die Gegenüberstellung von Parenchym aus exponierten und Kontrolltieren bestätigte, daß es durch unsere Inhalationsexposition zur Ausbildung einer milden Silikose kam, die mit der chronisch unkomplizierten Form beim Menschen vergleichbar ist.

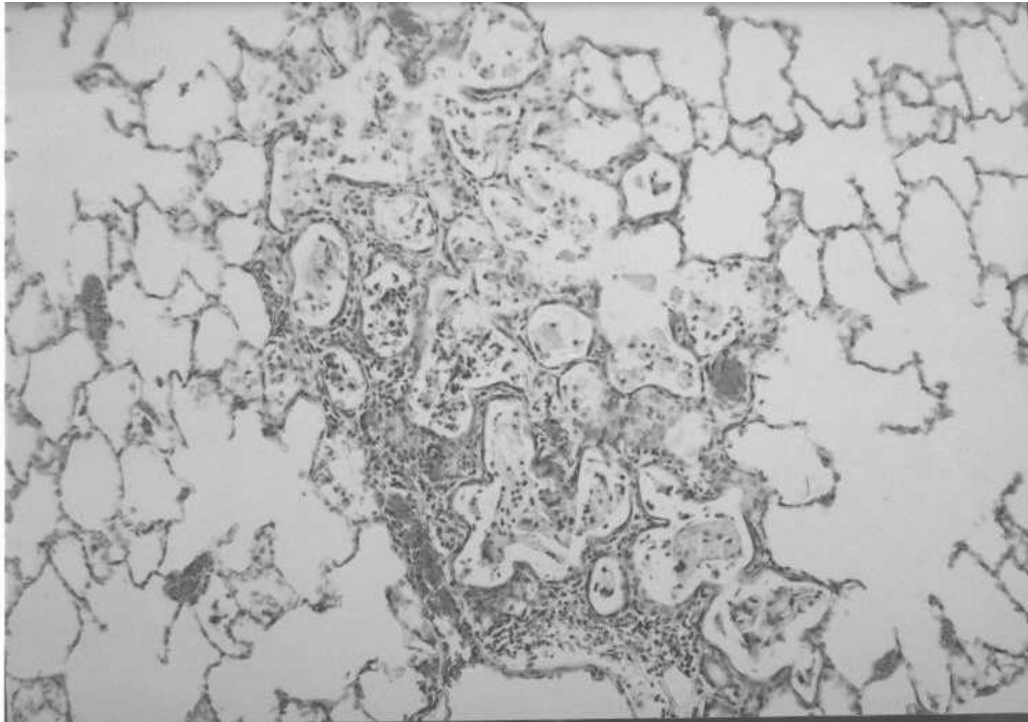


Abb. 3a: Lungengewebe 12 Mon. nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol, HE-Färbung, überlassen von A. Friedetzky

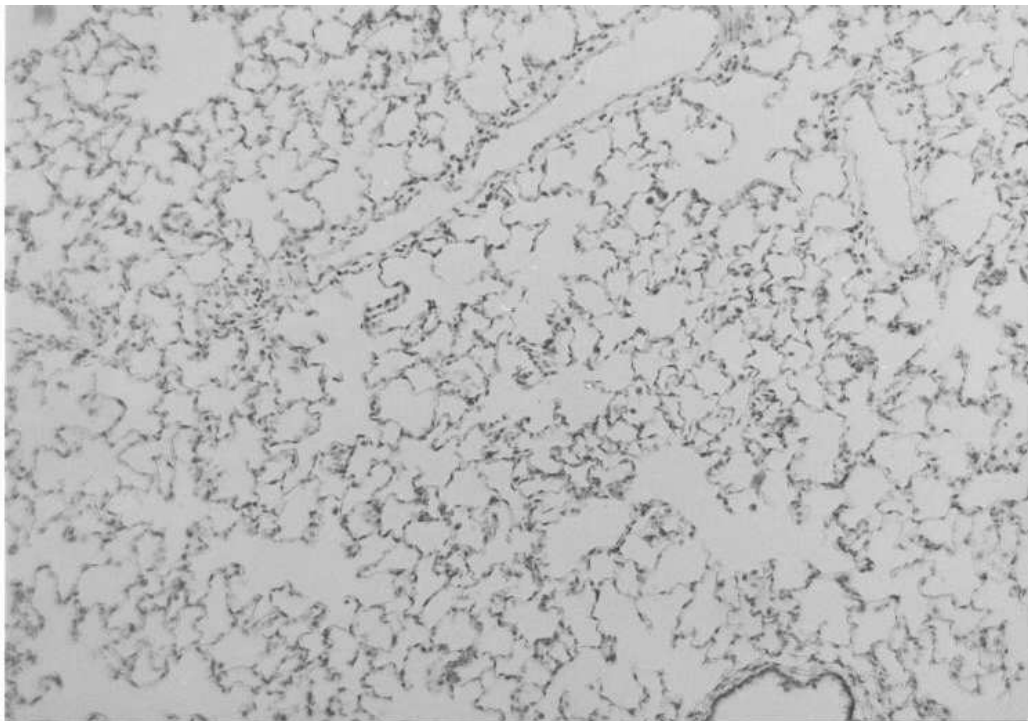


Abb. 3b: Lungengewebe 12 Mon. nach Exposition gegenüber staubfreier Trägerluft, HE-Färbung, überlassen von A. Friedetzky

Bei stärkerer Vergrößerung dieser silikotischen Knötchen stellten sich vielkernige Riesenzellen im Lumen der Alveolen dar. Derartige Riesenzellen können durch Synzytienbildung aktivierter Makrophagen entstehen. Zur Zellklassifizierung wurde eine immunhistochemische Detektion mit dem ED 1-Antikörper durchgeführt, der Makrophagen färbt (Damoiseaux, et al., 1994). In Abbildung 4 sieht man die positive Färbung der Riesenzellen durch ED 1-Antikörper, was bedeutet, daß es sich bei den Riesenzellen um Makrophagen handelt. In einem Großteil dieser Alveolarmakrophagen zeigten sich intrazellulär lokalisierte, phagozytierte Siliziumdioxidkristalle. Außerdem sieht man in den Alveolarsepten vereinzelt positiv detektierte Zellen, bei denen es sich um interstitielle Makrophagen handeln könnte.

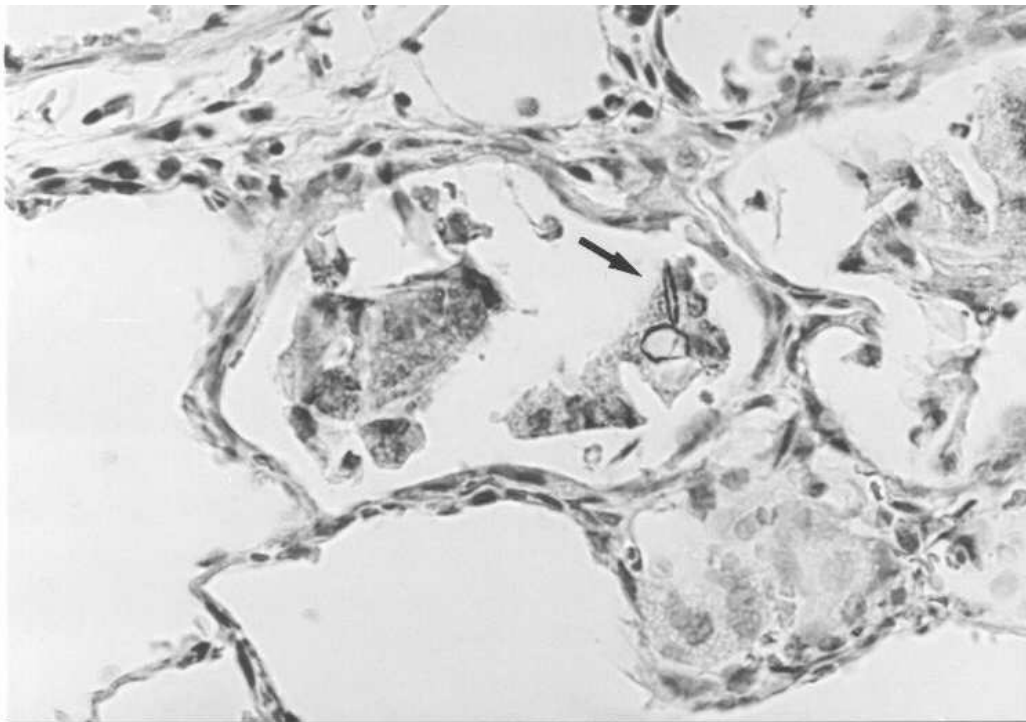


Abb. 4: Immunhistochemische Färbung mit anti-Makrophagen-spezifischem Antikörper ED1, HE-Gegenfärbung, gut sichtbar sind intrazelluläre Quarzkristalle (Pfeil), (ohne Inaktivierung der endogenen Peroxidase, weshalb die Erythrozyten ebenfalls braun gefärbt erscheinen)

### 3.2. Sequenzierung von Ratten MIF

Zu dem Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchung von MIF-mRNA-Expression im Modell der Silikose war weder die Basenpaarabfolge noch die Proteinsequenz des „Macrophage Migration Inhibitory Factor“ (MIF) der Spezies Ratte bekannt.

Da eine hohe Sequenz-Homologie zwischen murinem und humanem MIF besteht, wurde eine starke Homologie auch zur Ratten-MIF-Sequenz angenommen. Deshalb wurde zunächst eine PCR mit Primern durchgeführt, die zur Amplifikation eines Teils der murinen Sequenz etabliert worden waren. Als Matrize diente cDNA, die aus der RNA von in-vitro stimulierten Milzzellen der Ratte generiert worden war. Im Ergebnis der PCR entstand ein PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 290 bp. Diese Länge entsprach der Größe des PCR-Produktes, das bei der Amplifikation der murinen MIF-Sequenz entsteht. Dies ließ vermuten, daß mit dieser Methode tatsächlich ein Abschnitt der MIF-Sequenz der Ratte amplifiziert worden war.

Zur Verifizierung dieser Annahme wurde das PCR-Produkt mittels TA-Kloning in den PCR<sup>TM</sup> II-Vektor kloniert, mit dem anschließend kompetente E. coli-Zellen transformiert wurden. Das aus einem positiven Klon gereinigte Plasmid wurde mit DIG-markierten Sp6-bzw. T7-Primern sequenziert.

Abbildung 5a zeigt einen Ausschnitt der Sequenziermembran und in Abbildung 5b ist die Basenabfolge des in dieser Arbeit sequenzierten Abschnittes der Ratten-MIF-Sequenz dargestellt. Die Analyse mittels Sp6 und T7 lieferte exakt komplementäre Sequenzen, so daß von einer fehlerfreien Sequenzierung ausgegangen werden kann.

Der komplette sequenzierte Abschnitt meiner cDNA wurde in Abbildung 5b mit Markierung der Primerbindungsstellen festgehalten.

In der zeitgleich veröffentlichten Arbeit von Sakai et al. (1994) wird eine Nukleinsäure-Homologie des Ratten-MIF zur humanen und murinen Sequenz mit 89,4 % bzw. 97,1 % angegeben. Auf Proteinebene bedeutet das einen Unterschied in 12 bzw. 1 Aminosäure.

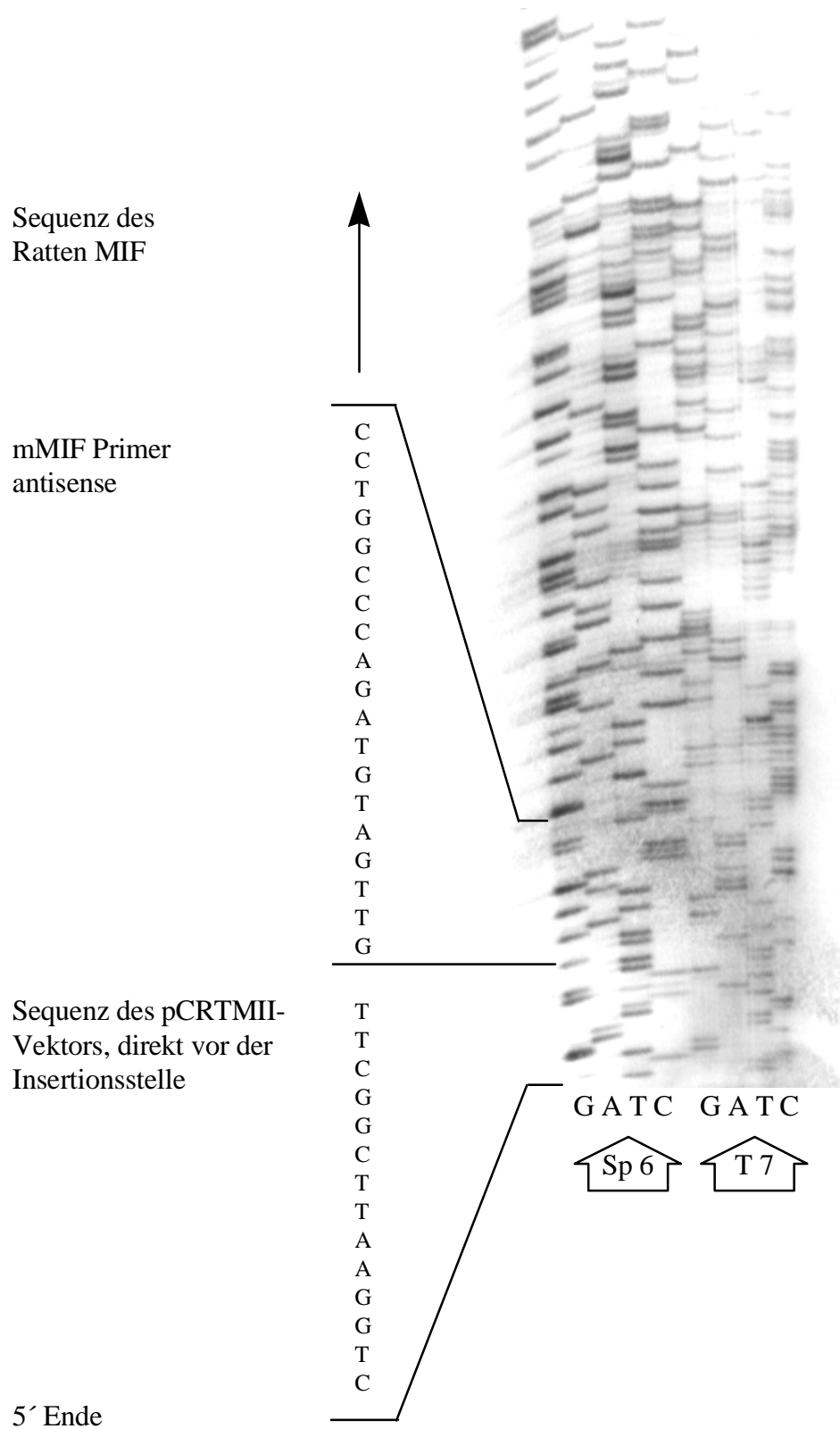


Abb. 5a: Partielle Darstellung der Direkt-Blotting-Sequenz-Membran nach Farbnachweis der DIG-Markierung zur Analyse der Ratten-MIF-Sequenz

---

5'-GGA TAT CTG CAG AAT TCG GCT TCC TAT GTT CAT CGT GAA CAC C

| Primer 1 |

AA TGT TCC CCG CGC CTC CGT GCC AGA GGG GTT TCT CTC CGA

GCT CAC CCA GCA GCT GGC GCA GGC CAC CGG CAA GCC GGC ACA

GTA CAT CGC AGT GCA CGT GGT CCC GGA CCA GCT CAT GAC TTT TAG

TGG CAC GAG CGA CCC CTG CGC CCT CTG CAG CCT GCA CAG CAT

CGG CAA GAT CGG TGG CGC CCA GAA CCG CAA CTA ACG CAA GCT

GCT GTG CGG CCT GCT GTC CGA TCG CCT GCA CAT CAG CCC

GGA CCG GGT CTA CAT CAA CAA GCC GAA TTC -3'

CCT GGC CCA GAT GTA GTT G

| Primer 4 |

---

Abb. 5b: Nukleotidabfolge des sequenzierten Abschnittes von Ratten-MIF

### **3.3. Vergleich der mRNA-Expression von GAPDH, MIF und einigen Chemokinen in verschiedenen Zellpopulationen anhand eines Tiermodells der chronischen Silikose**

Die vorliegende Arbeit untersuchte Veränderungen in der Lunge bei chronisch, unkomplizierter Silikose am Tiermodell. Die Manifestation dieser Krankheit ließ sich in allen Tieren durch histologische Analysen des Lungengewebes nachweisen (siehe 3.1.). Es war von Interesse, ob diese morphologischen Veränderungen auch mit einer alterierten Zellaktivierung im Lungengewebe der exponierten Tiere einherging.

Es wurden Einzeltiere untersucht. Der Vorteil gegenüber der Analyse eines Zellpools bestand darin, interindividuelle Unterschiede nicht zu nivellieren. Dem Nachteil der geringeren Menge an Untersuchungsmaterial bei Analyse von Einzeltier-Proben konnte durch Anwendung molekularbiologischer Methoden begegnet werden.

Es wurden drei verschiedene Zellpopulationen auf ihre mRNA-Expression verschiedener Zytokine untersucht. Es wurde das gesamte Lungengewebe, aber auch zur genaueren Zuordnung der veränderte Genexpression pulmonale Subpopulationen untersucht.

#### **3.3.1. Analysierte Gewebe und Zellen**

##### **3.3.1.1. Zellen aus Gesamtlungengewebe**

Aus einigen Tieren wurde das gesamte Lungengewebe ohne weitere, spezifische Präparation zur Isolation von RNA genutzt. Alle PCR-Analysen, die im folgenden mit „Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition“ beschriftet wurden, entstanden durch Amplifikationen aus dem selben cDNA-Ansatz. Die Auswertung erfolgte durch gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung.



### **3.3.1.2. Zellen aus dem Alveolarraum und dem Interstitium der Lunge**

Eine weitere Gruppe an Tieren mit identischem Zeitintervall nach Exposition dienten zur Isolation alveolärer und interstitieller Zellen. Dadurch sollte zwischen einer Alteration der Zellen im belüfteten Kompartiment versus der im Gewebsverband befindlichen Zellen unterschieden werden.

Wie unter 2.2.4.1. beschrieben wurden durch Broncho-Alveoläre-Lavage (BAL) Zellen aus den Atemwegen isoliert. Auf eine weitere Zellseparation wurde verzichtet, da erstens bei den Kontrolltieren sehr wenige Zellen durch die BAL zu gewinnen waren und zweitens eine anschließende Präparation zu einer Aktivierung der Zellen geführt hätte. Aus dieser Zellsuspension wurde Gesamt-RNA präpariert und anschließend daraus unter Verwendung von dT-Dynabeads (Dynal, Hamburg) die mRNA selektiv isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben. Alle Analysen der mRNA-Expression, die mit „Zellen aus der BAL“ beschriftet sind, basieren auf derselben cDNA-Synthese.

Die Auswertung der PCR-Analysen erfolgte durch Dot-Blots.

Bei allen diesen Tier schloß sich an die BAL die Präparation der interstitiellen Zellpopulation an. Auch hier wurde auf eine weitere Aufbereitung der Zellen verzichtet, um ex vivo-Analysen zu gewährleisten. Aus der Zellsuspension wurde Gesamt-RNA präpariert. Aus dieser RNA wurde durch oligo-dT-Dynabeads (Dynal, Hamburg) selektiv mRNA isoliert und diese dann in cDNA transkribiert. Alle PCR-Daten mit der Beschriftung „Expression in der interstitiellen Zellpopulation“ wurden durch Amplifikation aus demselben cDNA-Ansatz gewonnen. Die Auswertung der PCRs erfolgte analog zu den alveolären Zellen über Dot-Blots.

### **3.3.2. DNA-Sonden für den Dot-Blot-Nachweis**

Mit dem folgenden Abschnitt soll die Qualität der DNA Sonden dokumentiert werden, die einen spezifischen Nachweis von PCR-Produkten im Dot-Blot-Verfahren gewährleisten.

In der Abbildung 6 sind für jedes Zytokin drei Proben aufgetragen worden. Die erste Spur zeigt das DIG-markierte PCR-Produkt. In der nächsten Spur wurde das Produkt aufgetragen, das bei gleicher Primerpaarung, jedoch ohne DIG-dUTP-Zugabe zur Synthese, entsteht. Die DIG-Markierung führt bei gleicher Produktlänge zu einer sterischen Veränderung, die sich in einer langsameren Laufgeschwindigkeit des DNA-Fragmentes bei der Gelelektrophorese widerspiegelt. Die dritte Spur zeigt Negativ-Kontrolle der PCR.

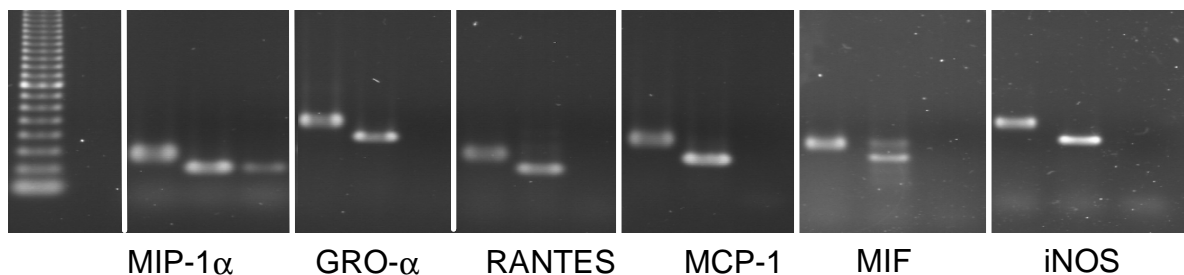


Abb. 6: PCR für verschiedene Zytokine, mit DIG-Markierung, ohne DIG-Markierung und neg. Kontrolle

### 3.3.3. GAPDH als „house-keeping-gene“

Bei Studien im Tiermodell besteht eine Schwierigkeit darin, die molekularbiologischen Untersuchungen auf eine identische Menge an Untersuchungsmaterial zu beziehen. Das ist bei der hohen Sensitivität der PCR-Untersuchung von besonderer Bedeutung.

Neben einer einheitlichen Zellpräparation und standardisierten RNA-Präparation bestimmt man deshalb vor der cDNA-Synthese photometrisch den RNA-Gehalt jeder Probe, um dann gleiche Mengen RNA in cDNA zu transkribieren.

In einer anschließenden PCR zur Kontrolle der erfolgreichen cDNA-Synthese analysiert man sogenannte „house-keeping-genes“. Das sind Gene, die unabhängig von dem Aktivierungsstatus einer Zelle als mRNA vorliegen und somit direkt mit der präparierten Anzahl an Zellen korrelieren. In dieser Arbeit

wurde GAPDH als konstitutiv exprimiertes Gen untersucht (Watson et al., 1993).

### 3.3.3.1. GAPDH-mRNA-Expression in Zellen aus Gesamtlungengewebe

Die Untersuchung der GAPDH-Expression in den Zellen aus der Gesamtlunge diente dem Nachweis, daß für jedes Tier gleiche Mengen an Zellen analysiert wurden.

Die Abbildung 7 veranschaulicht die Ergebnisse der PCR-Analyse zur GAPDH-mRNA-Expression. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der GAPDH Expression zwischen Kontroll- und Silikotetieren, was eine zufriedenstellende Nivellierung der Proben bedeutet.

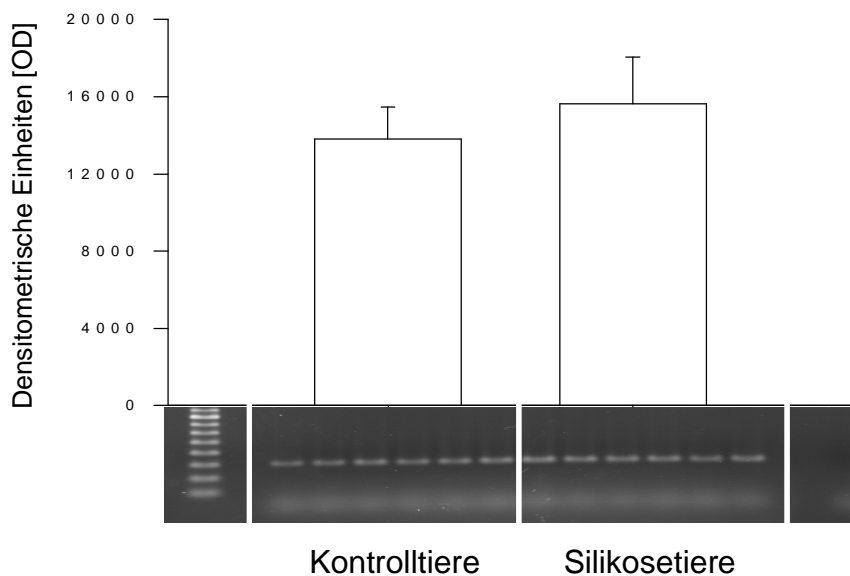


Abb. 7: GAPDH-mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 35 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  für jeweils 6 Tiere.

### 3.3.3.2. GAPDH-mRNA-Expression in den Lungenpopulationen

Die Zellen aus der Broncho-Alveolären-Lavage wurden auf ihre Expression des GAPDH-Genes mittels PCR untersucht. Um einen genaueren Vergleich der Tiere untereinander zu erreichen, wurden die PCR-Produkte über Dot-Blots ausgewertet.

Anhand dieser GAPDH-PCR wurde eine Auswertungsschema definiert (schwarze Umrahmung), das in allen weiteren Dot-Blots alveolärer Proben angewandt wurde.

Es zeigte sich bei der statistischen Auswertung der Optischen Dichte der Dots der GAPDH-PCR-Produkte eine ausreichende Übereinstimmung der beiden Vergleichsgruppen der alveolären Population (Abb. 8).

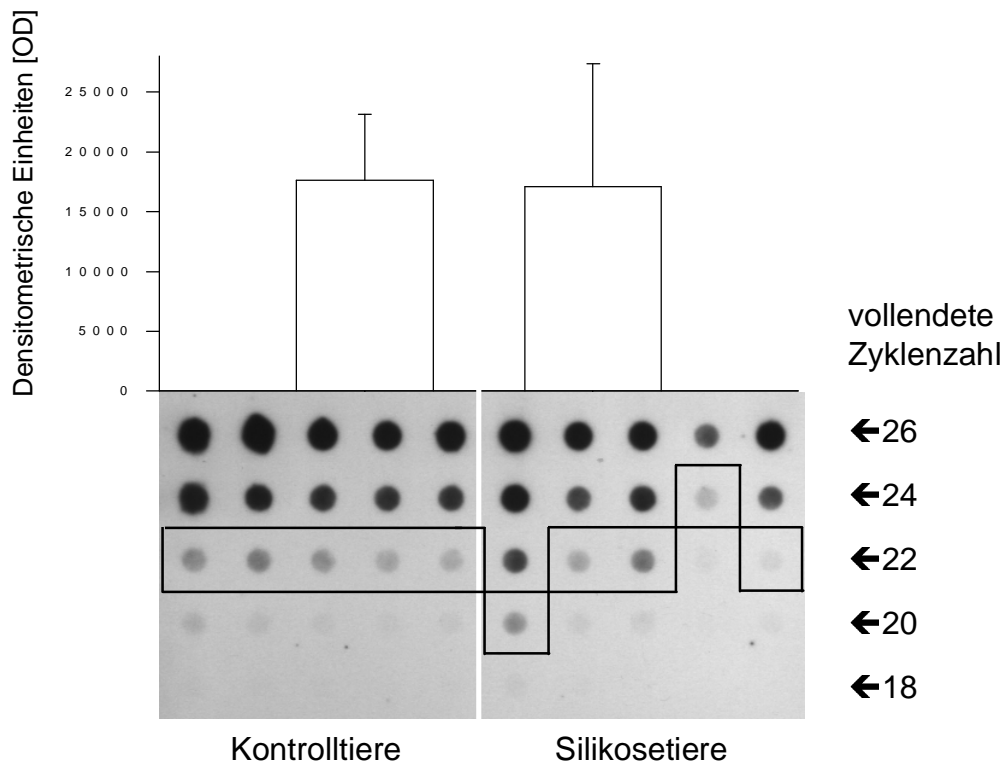


Abb. 8: GAPDH-mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

In dieser Abbildung 8 wurde die unter 2.4.7.3.1. erklärte und in Abb.1 gezeigte, ausführliche Beschriftung noch einmal exemplarisch ergänzt. Dieses Prinzip der Probenauftragung findet sich in allen folgenden Dot-Blot Darstellungen in identischer Form.

Die Interstitielle Zellpopulation wurde analog zu den alveolären Zellen auf ihre GAPDH-Genexpression untersucht und die PCR über das Dot-Blot Verfahren mit Definition eines Auswertungsfensters visualisiert.

Die Kontrolltiere und exponierten Tiere zeigten gleich starke GAPDH-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation (Abb. 9).

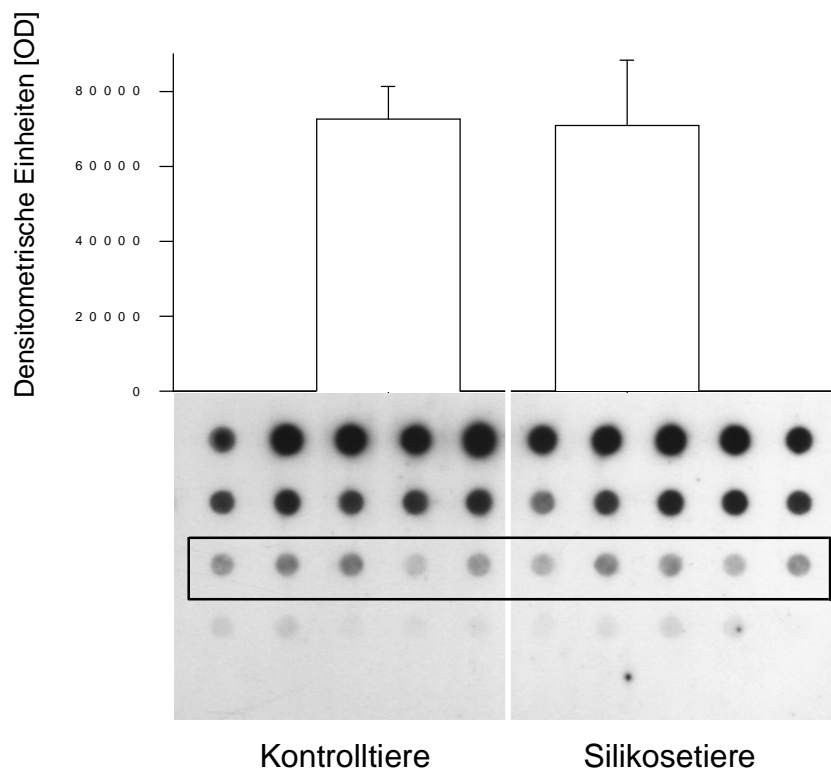


Abb. 9: GAPDH-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

### **3.3.4. MIF im Tiermodell der chronischen Silikose**

MIF ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin, das von einer Vielzahl von Zellen produziert werden kann. Es wirkt hemmend auf die Migration von Makrophagen und wird auch von ihnen produziert. Da die  $\alpha$ -Christobalit-Kristalle in der Lage sind, Makrophagen zu stimulieren, war es von Interesse, ob MIF bei Ausbildung der Silikose eine Rolle spielt.

#### **3.3.4.1. Immunhistochemische Detektion von MIF-Protein**

Aus diesen Gründen wurde eine immunhistochemische Färbung mit anti-MIF-Antikörpern auf Lungenschnitten durchgeführt. Zwei Fragen sollten beantwortet werden. Einerseits sollte geklärt werden, ob überhaupt nachweisbare Mengen an MIF-Protein im Lungengewebe produziert werden. Andererseits sollte darüber hinaus eine Zellzuordnung erreicht werden.

Als Fokus des Interesse wurde der histologische Schnitt durch ein silikotisches Knötchen untersucht, da diese Struktur durch die  $\alpha$ -Christobalit-bedingten Entzündung entsteht. Wie in Abb. 4 bereits gezeigt, handelt es sich bei den Zellen der silikotischen Läsionen um Makrophagensynzytien. Im Zytoplasma dieser vielkernigen, alveolärer Makrophagen zeigten sich MIF-AK-bindende Strukturen. In Abbildung 10 stellt sich diese positive Detektion durch eine bräunliche Färbung des Zytoplasmas der Makrophagen dar. Auch in einigen Lungenzellen, z.B. im rechten unteren Quadranten, sieht man eine positive Farbreaktion. Schlußfolgernd aus der Alveolen-angrenzenden Lage der Zellen und der relativ geringen Anzahl, handelt es sich möglicherweise um Typ-II-Pneumozyten.

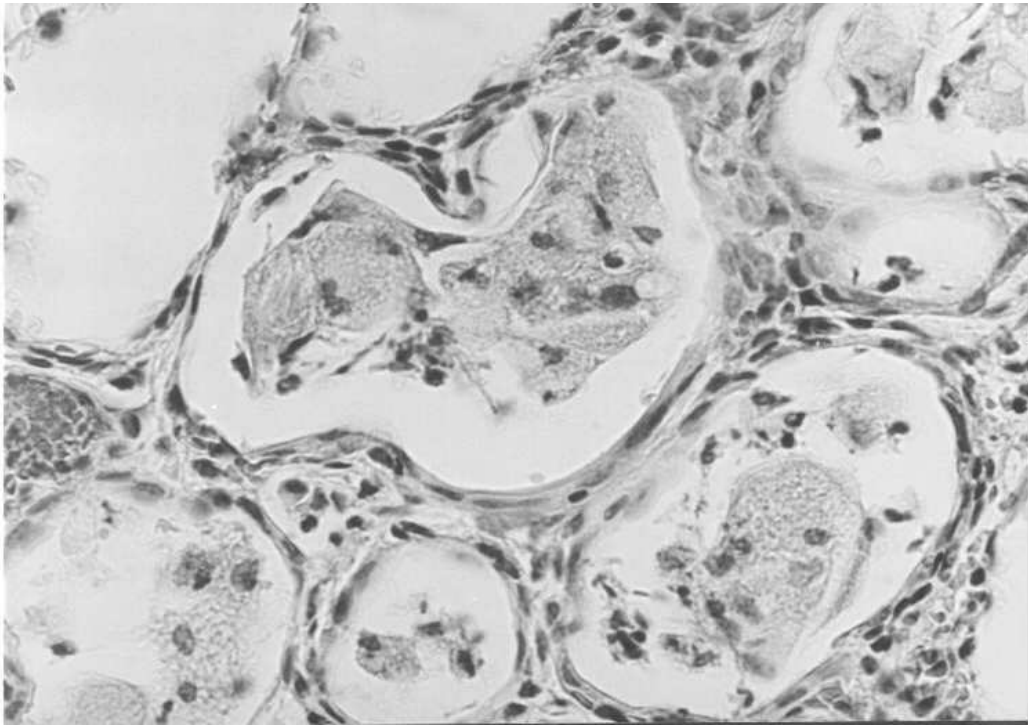


Abb. 10: Lungengewebe 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol, Immunhistochemische Färbung mit anti-MIF-Antikörpern, HE-Gegenfärbung (ohne Inaktivierung der endogenen Peroxidase, weshalb die Erythrozyten ebenfalls braun gefärbt erscheinen).

Ein Vergleich dieses MIF-Protein-Vorkommens in Silikotieren mit nicht exponierten Kontrollen ließ sich nicht durchführen, da unstimulierte Alveolarmakrophagen nicht im histologischen Schnitt nachweisbar waren. Deshalb wurden molekularbiologische Methoden zur Analyse der MIF-mRNA-Expression in beiden Untersuchungsgruppen angeschlossen.

#### **3.3.4.2. Expression der MIF-mRNA in der Gesamtlunge**

Es galt zu klären, ob der immunhistochemisch gelungene Nachweis von MIF-Protein in silikotischen Läsionen in einer gesteigerten MIF-mRNA-Expression in Lungenzellen von erkrankten Tieren begründet liegt. Deshalb wurden die

Zellen aus der Gesamtlunge mittels einer MIF-spezifische PCR auf diese Genexpression untersucht. In Abbildung 11 werden die Daten der MIF-Expression in der Gesamtlunge demonstriert.

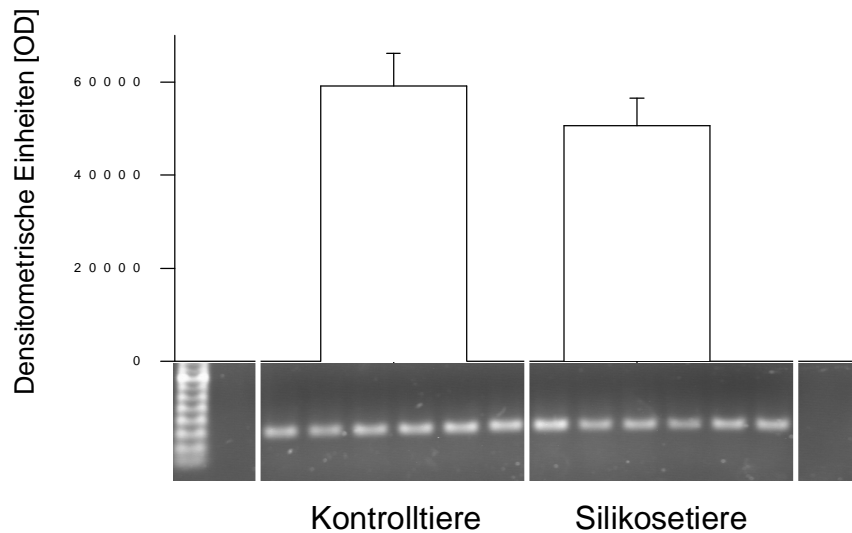


Abb. 11: MIF-mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  für jeweils 6 Tiere.

Entgegen den Erwartungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der MIF-mRNA-Expression in Zellen der Gesamtlunge zwischen den exponierten Tieren und der Kontrollgruppe.

#### 3.3.4.3. Expression der MIF-mRNA in den Lungenpopulationen

Da die Quarz-Kristalle zuerst mit den alveolären Makrophagen in Kontakt treten, sollte mit der folgenden PCR-Untersuchung herausgefunden werden, ob es im Gegensatz zur mRNA-Detektion im Gesamtlungen-Zellpool zu einer Veränderung der MIF-mRNA-Expression in den Zellen des Alveolarraums kommt. Darüber hinaus wäre es möglich, daß die in den Bronchioli terminales



und Alveolen sitzenden silikotischen Riesenzellen bei erkrankten Tieren zu einer erhöhten MIF-mRNA-Expression in dem Pool der BAL-Zellen führen.

Die Zellen aus der BAL der  $\alpha$ -Christobalit-exponierten Tiere zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der MIF-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 12).

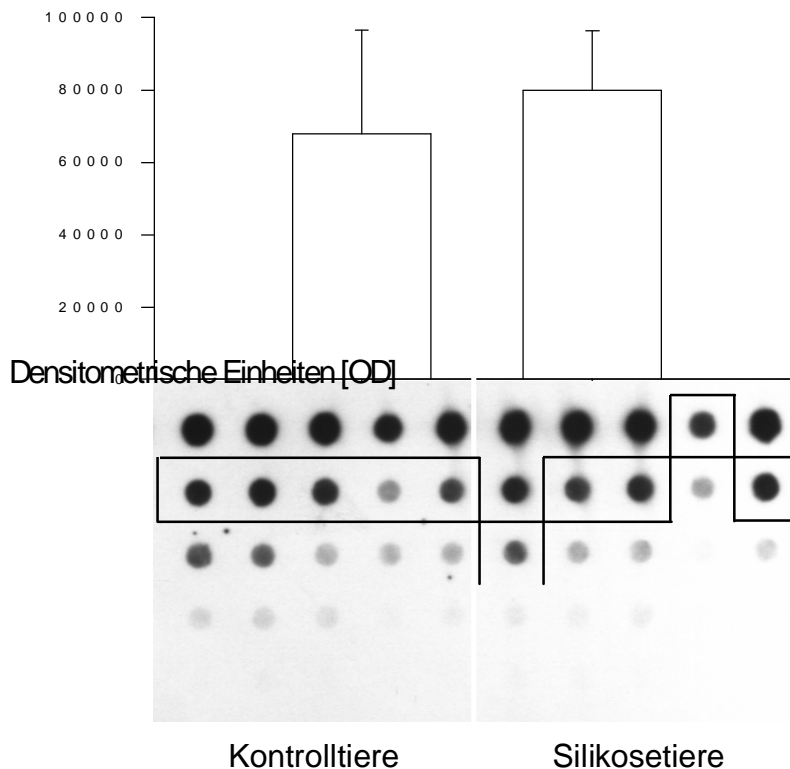


Abb. 12: MIF-mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft. (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der PCR-Analyse der MIF-mRNA-Expression in Zellen des Interstitiums dargestellt. Es fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Vergleichsgruppen.

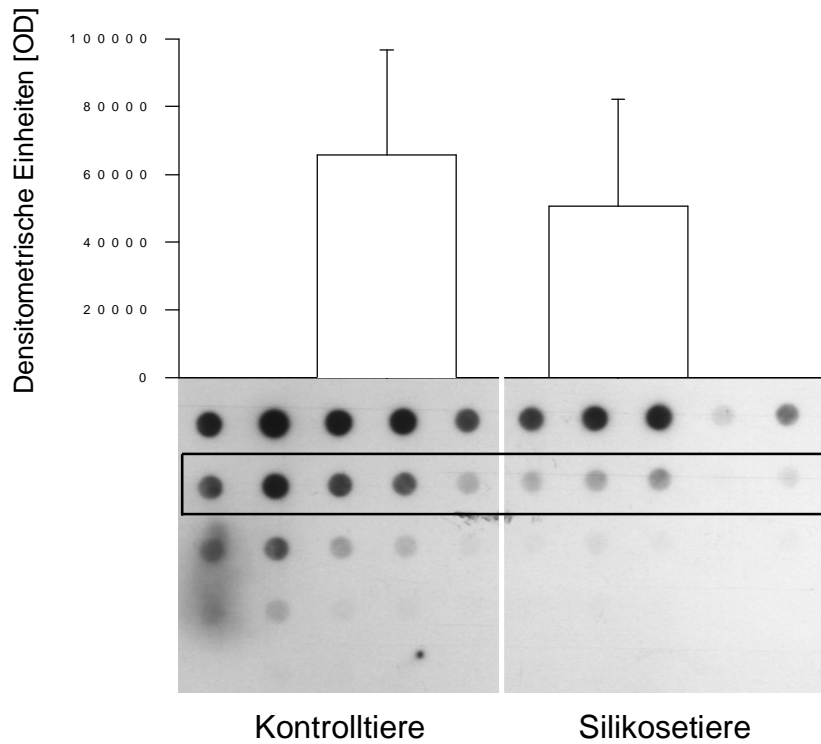


Abb. 13: MIF-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

### **3.3.5. Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener CC-Chemokine im Tiermodell der chronischen Silikose**

Es ist bekannt, daß in der Broncho-Alveolären-Lavage bei an Silikose-erkrankten Tieren eine erhöhte Zahl inflammatorischer Zellen gewonnen wird. Dabei konnte Amann (1997) auch eine veränderte Zellzusammensetzung der BAL nachweisen. Für eine Rekrutierung immunkompetenter Zellen an den Ort der Entzündung können neben klassischen Chemotaxinen, wie z.B. C3a und C5a, vor allem die Chemokine verantwortlich sein. Sie sind in der Lage, Zellen bestimmter Funktion selektiv anzulocken. Die Rolle einiger Chemokine wurde anhand ihrer mRNA-Expression in diesem Tiermodell untersucht. Die Gruppe der CC-Chemokine ist dabei besonders interessant, da sie vor allem auf Monozyten, die Vorstufen der Makrophagen, aber auch auf Lymphozyten chemotaktisch wirken. Als Vertreter dieser Chemokin-Gruppe wurden MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES untersucht.

#### **3.3.5.1. Expression der MCP-1-mRNA in der Gesamtlunge**

Das „Monocyte chemoattractant Protein-1“, kurz MCP-1, gehört in die Gruppe der CC-Chemokine und hat, wie der Name bereits andeutet, u.a. anziehende Wirkung auf die Monozyten-Makrophagen-Zelllinie. Es wurde im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Krankheiten untersucht. Mit den folgenden PCR-Analysen soll das MCP-1 auf eine veränderten mRNA-Expression bei der chronischen Silikose untersucht werden. Da es bei einigen fibrosierenden Erkrankungen erhöht exprimiert wird (siehe Einleitung), konnte mit einer gesteigerten Expression auch im vorliegenden Modell gerechnet werden.

Untersucht man die Expression des MCP-1-Genes in Zellen der Gesamtlunge (Abb. 14), so konnte eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den  $\alpha$ -Christobalit-exponierten Tieren verzeichnet werden.

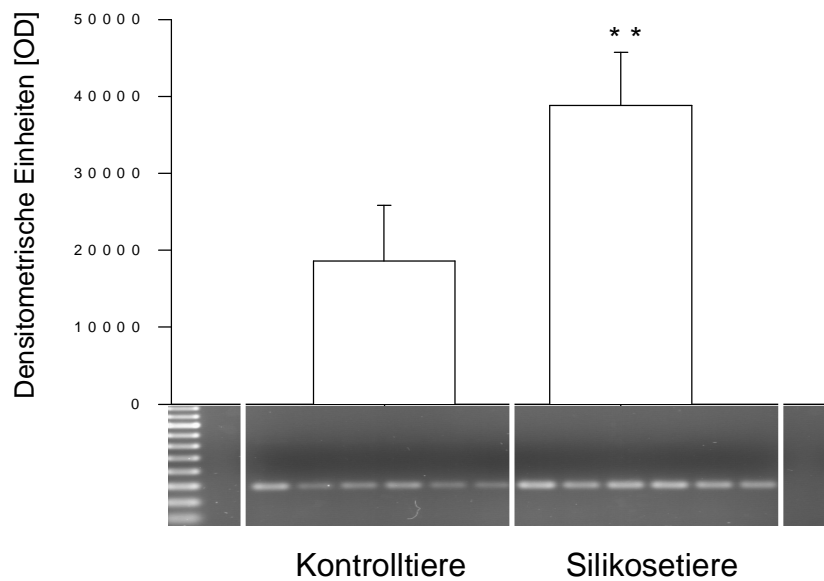


Abb. 14: MCP-1-mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 35 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  für jeweils 6 Tiere (\*\*:  $p < 0,01$ ).

Dieser deutliche Unterschied sollte durch einen Northern Blot für MCP-1 bestätigt werden. Dazu wurden 2  $\mu$ g RNA der ansonsten für cDNA-Synthese verwendeten RNA aus der Gesamtlunge elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Abbildung 15 zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte RNA-Gel, das zum einen der photometrischen Analyse, aber auch der Qualitätskontrolle der Präparation diente. Als Ausdruck einer sauberen RNA-Präparation sieht man deutlich die 18s und 28s Banden der RNA.

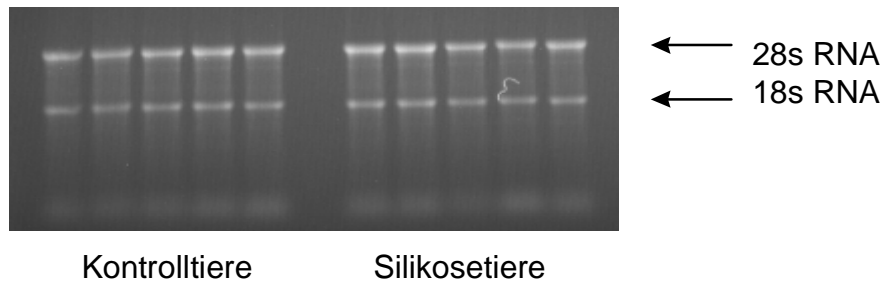


Abb. 15: RNA aus Zellen der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (gelelektrophoretische Auftrennung und Ethidiumbromidfärbung)

Zur Verifizierung gleich eingesetzter RNA-Mengen wurde eine spezifische Detektion mit GAPDH-Sonden durchgeführt. Die Banden dieser Untersuchung wurden in Abbildung 16 der MCP-1 Detektion gegenübergestellt. Bei nicht optimaler Einstellung der RNA-Proben sieht man dennoch eine deutlich erhöhte Menge an mRNA für MCP-1 in den erkrankten Tieren. Die Ergebnisse der PCR ließen sich somit bestätigen.

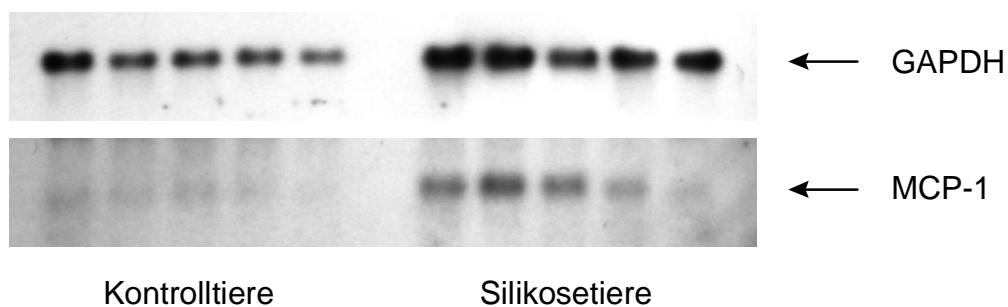


Abb. 16: Northern-Blot für GAPDH und MCP-1 von RNA aus Zellen der Gesamtlunge 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft

### 3.3.5.2. Expression der MCP-1-mRNA in den Lungenpopulationen

In den beiden separat untersuchten Zellpopulationen der Lunge wiederholte sich die tendenziell erhöhte mRNA-Expression in den an Silikose-erkrankten Ratten. Durch große interindividuelle Schwankungen waren die Werte jedoch nicht signifikant.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der MCP-1 PCR basierend auf die cDNA aus alveolären Zellen als Dot Blot dokumentiert. Der Unterschied in der mRNA-Expression für MCP-1 ist im Alveolarraum der Vergleichsgruppen nicht signifikant.

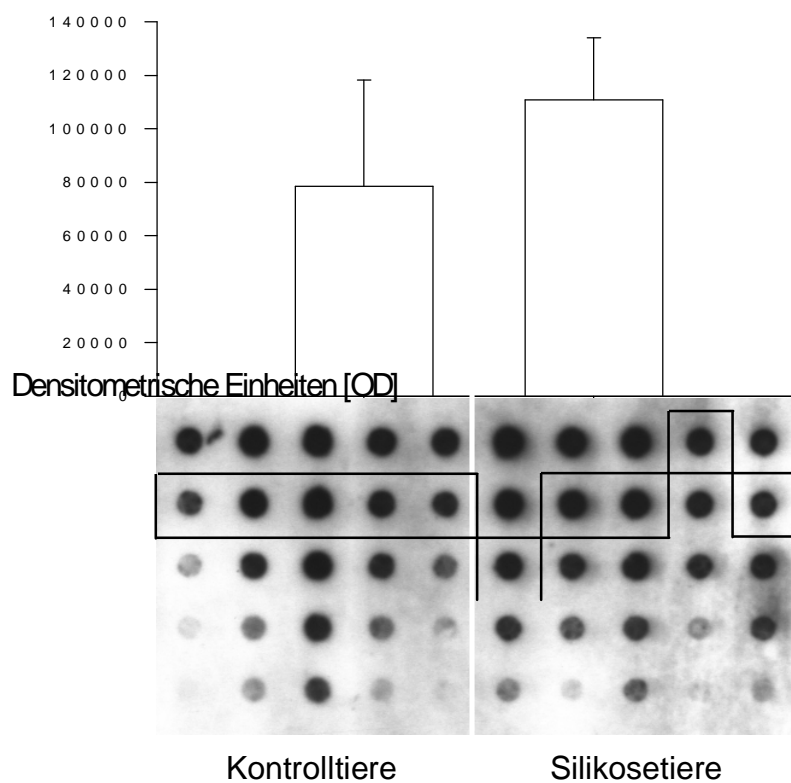


Abb. 17: MCP-1-mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

Die Abbildung 18 veranschaulicht die Ergebnisse der PCR mit cDNA der interstitiellen Zellpopulation. Die MCP-1 mRNA-Expression in Zellen des Lungeninterstitiums exponierter Tiere differiert nicht signifikant von den gesunden Vergleichstieren.

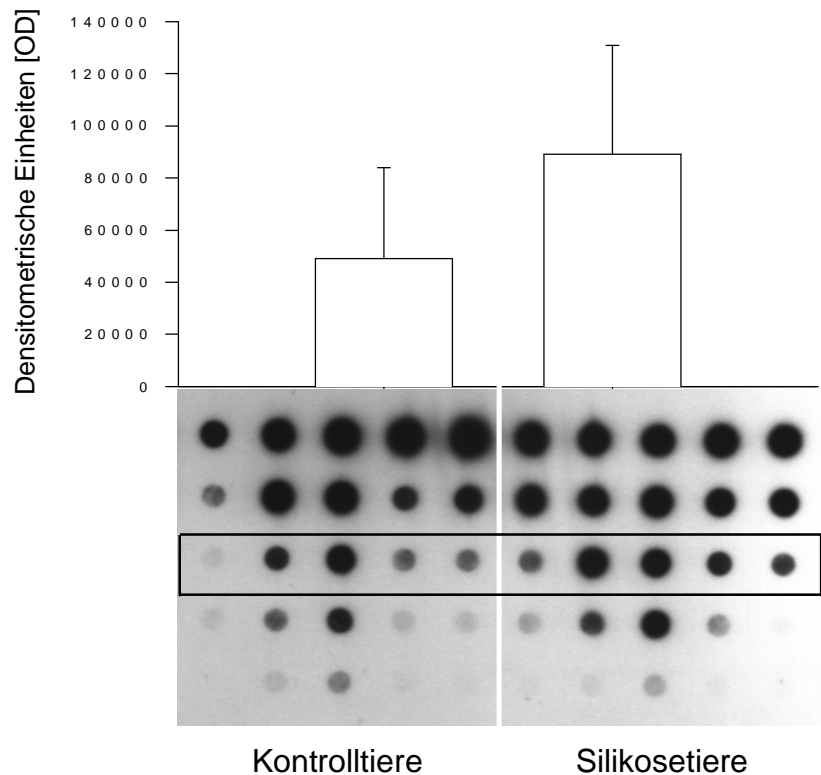


Abb. 18: MCP-1-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

### 3.3.5.3. Expression der MIP-1 $\alpha$ -mRNA in der Gesamtlunge

MIP-1 $\alpha$  ist ein klassischer Vertreter der Monozyten-Chemotaxine. Aus diesem Grund wurde seine mRNA-Expression untersucht.

Im den Zellen aus der Gesamtlunge der an Silikose erkrankten Tieren zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der MIP-1 $\alpha$ -mRNA (Abb. 19).

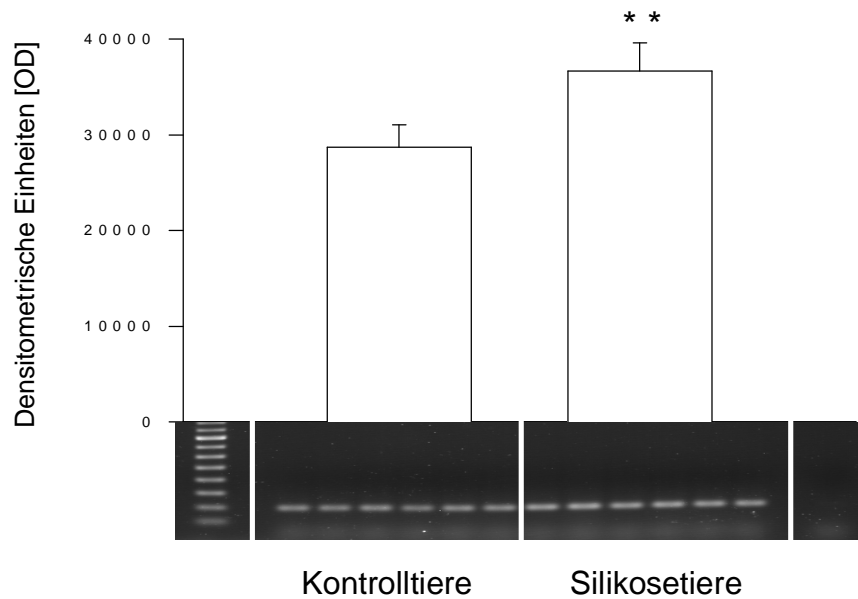


Abb. 19: MIP-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 35 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der OD $\pm$ SD für jeweils 6 Tiere (\*\*: p < 0,01).

#### 3.3.5.4. Expression der MIP-1 $\alpha$ -mRNA in den Lungenpopulationen

Zur Klärung der Frage, ob an der signifikant erhöhten mRNA-Expression von MIP-1 $\alpha$  in Lungen exponierter Tiere eine der untersuchten Lungensubpopulation in stärkerem Ausmaße beiträgt, wurde der alveoläre und interstitielle Zellpool entsprechend untersucht.

Die Intensität der mRNA-Expression dieses CC-Chemokins in Zellen des Alveolarraumes wird in Abbildung 20 demonstriert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der erkrankten Tiere und den Kontrolltieren.



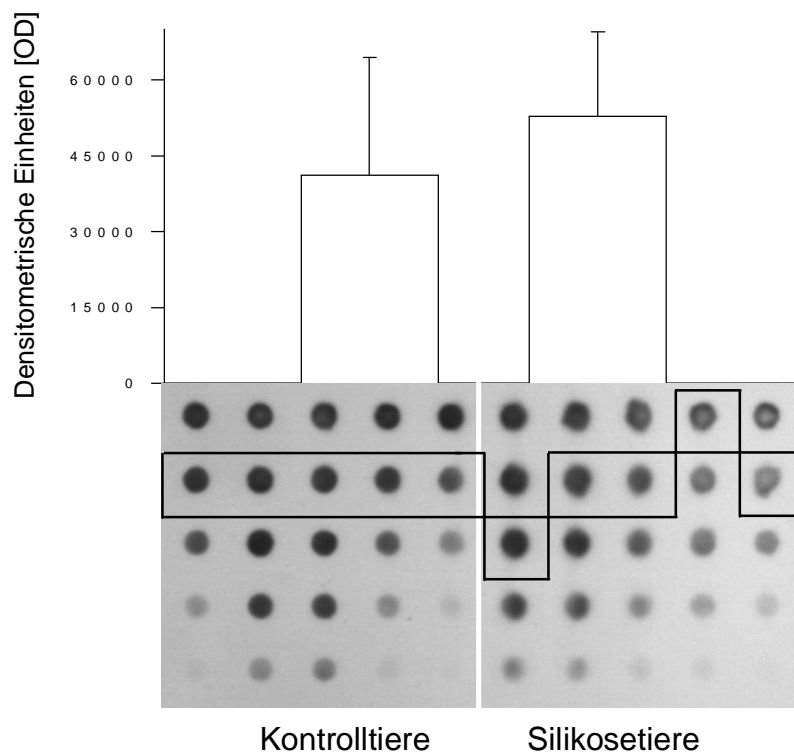


Abb. 20: MIP-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20 ,22 ,24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der OD $\pm$ SD der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

Die Untersuchung der interstitiellen Zellpopulation auf ihre mRNA-Expression für MIP-1 $\alpha$  erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den  $\alpha$ -Christobalit-exponierten Tieren und der Kontrollgruppe (Abb. 21). Auffällig sind die großen Schwankungen der PCR-Produktmenge zwischen den Proben der Einzeltiere.

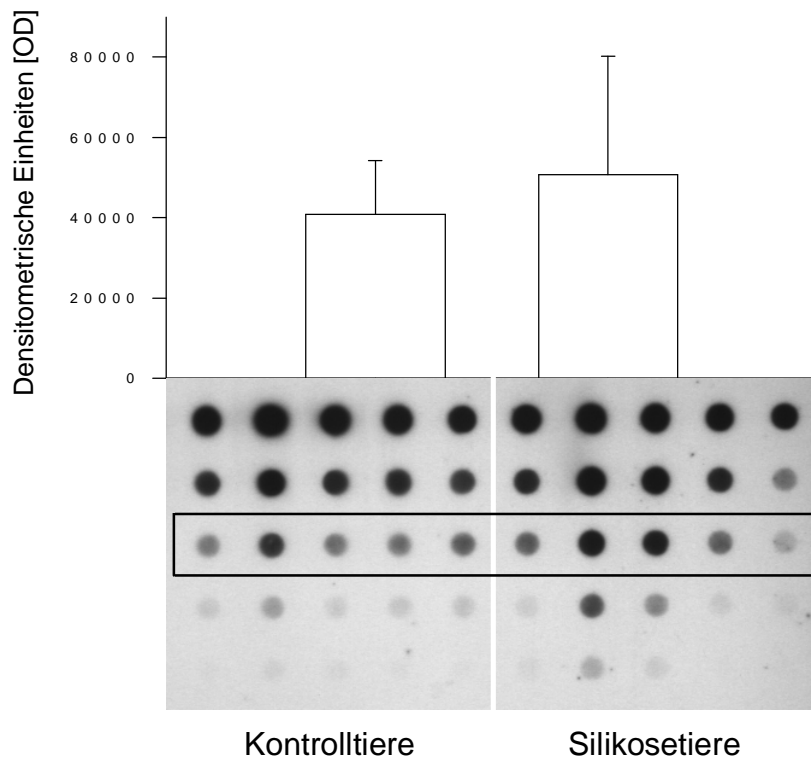


Abb. 21: MIP-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

### 3.3.5.5. Expression von RANTES-mRNA in der Gesamtlunge

RANTES ist ein Vertreter der CC-Chemokin-Subgruppe, das in einigen Fällen anders als die vorbeschriebenen Chemokine bei der Manifestation einer Krankheit reagiert. Es ist ein Chemotaxin für Makrophagen, aber auch für NK und T-Zellen und eosinophile und basophile Granulozyten.

Erstaunlicherweise ließen sich in der Lunge von Tieren mit chronischer Silikose durch die spezifische PCR signifikant erniedrigte mRNA-Kopien von RANTES nachweisen, was in Abb. 22 gezeigt wurde.

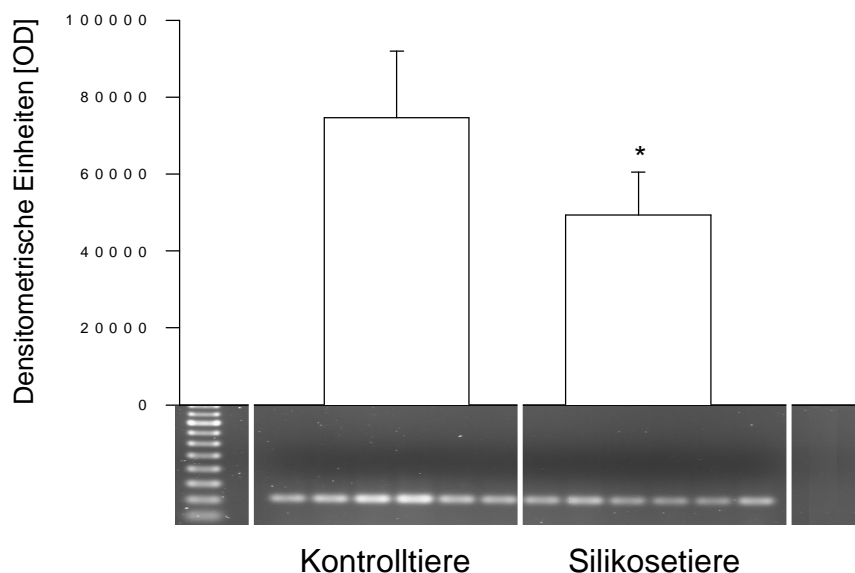


Abb. 22: RANTES-mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  für jeweils 6 Tiere (\*:  $p < 0,05$ ).

### 3.3.5.6. Expression der RANTES-mRNA in den Lungenpopulationen

Untersucht man Zellen aus der BAL hinsichtlich ihrer mRNA-Expression von RANTES, sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (Abb. 23).

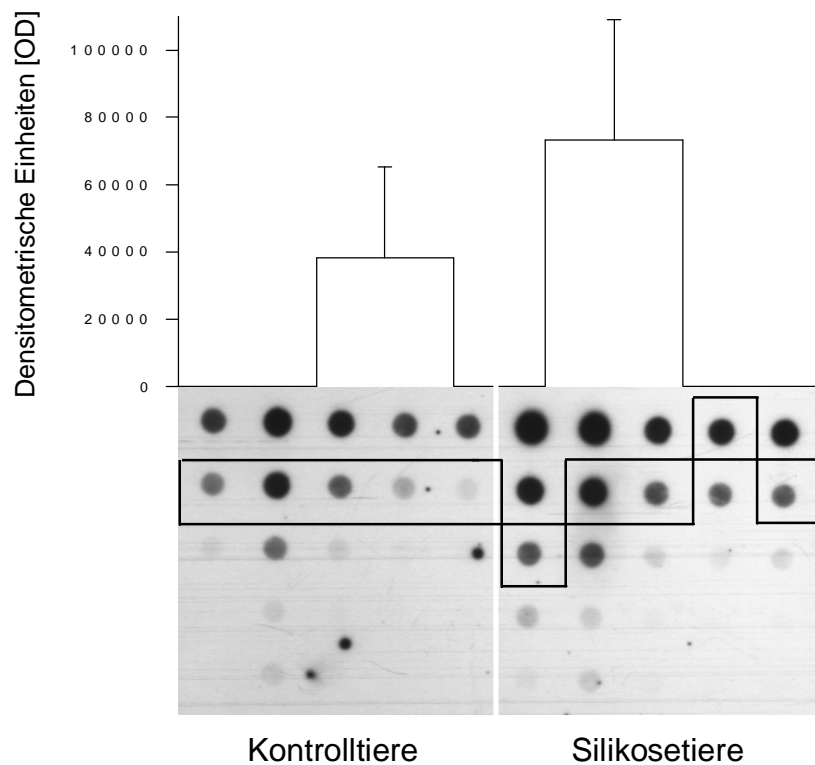


Abb. 23: RANTES-mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

Die Tendenz der RANTES-mRNA-Expression, die in der Gesamtlunge detektiert wurde, spiegelt sich auch in der Präparation interstitieller Zellen der Lunge wider, wenn auch durch hohe Probenvarianz ohne signifikante Differenz (Abb.24).

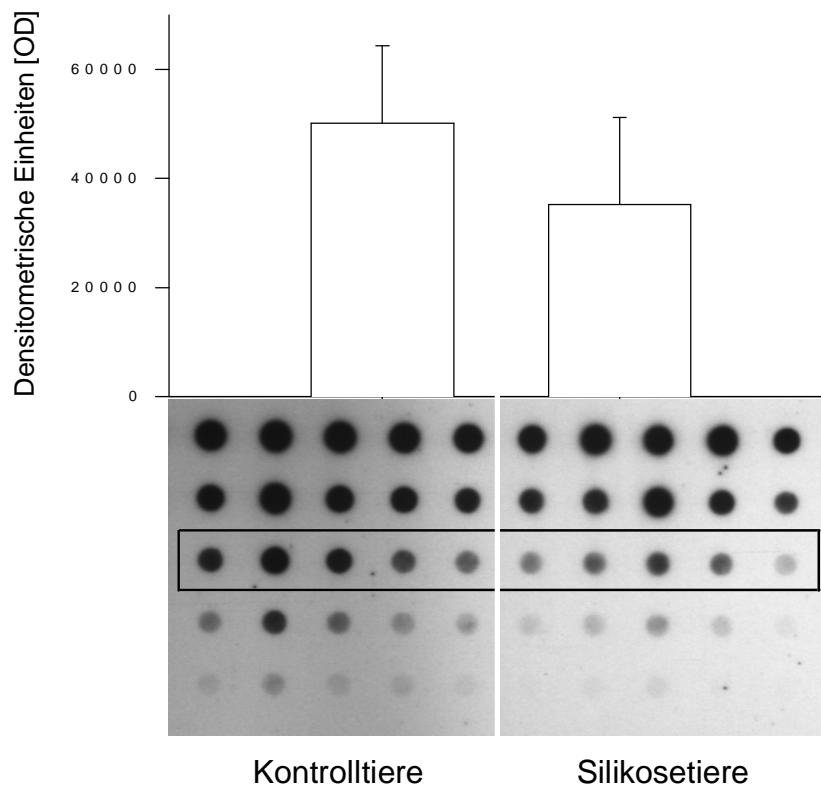


Abb. 24: RANTES-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

RANTES verhält sich demnach interessanterweise etwas anders als die vorgeschriebenen CC-Chemokine.

### 3.3.6. Expression der mRNA verschiedener CXC-Chemokinen im Tiermodell der chronischen Silikose

Einige CXC-Chemokine, vor allem die ELR-Motiv-tragenden, haben Einfluß auf die Migration neutrophiler Granulozyten. Anfänglich nach Staubinhalation kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die mit einer Einwanderung neutrophiler Granulozyten einhergeht. Es sollte nun die Dynamik der Silikose

im chronischen Krankheitsverlauf untersucht werden. Deshalb war es Intention der folgenden PCR-Analysen, die mRNA-Expression von CXC-Chemokinen in Gewebe und Zellen silikotischer Tiere zu vergleichen. Es wurden die in der Ratte bekannten CXC-Chemokine MIP-2 und GRO- $\alpha$  untersucht.

### 3.3.6.1. Expression der MIP-2-mRNA in der Gesamtlunge

Ein wichtiger Vertreter der CXC-Chemokine ist MIP-2. Wie in der Einleitung beschrieben, wurde es kurz nach  $\alpha$ -Quarz-Instillation in die Trachea von Ratten beobachtet. Deshalb war es von Interesse, wie sich die MIP-2 mRNA-Expression in dem in dieser Arbeit untersuchten Modell der chronischen Silikose verhält.

Die spezifische PCR für MIP-2 erbrachte in der Gesamtlunge keinen Unterschied in der mRNA-Expression zwischen der Gruppe der gesunden und der exponierten Tiere (Abb. 25).

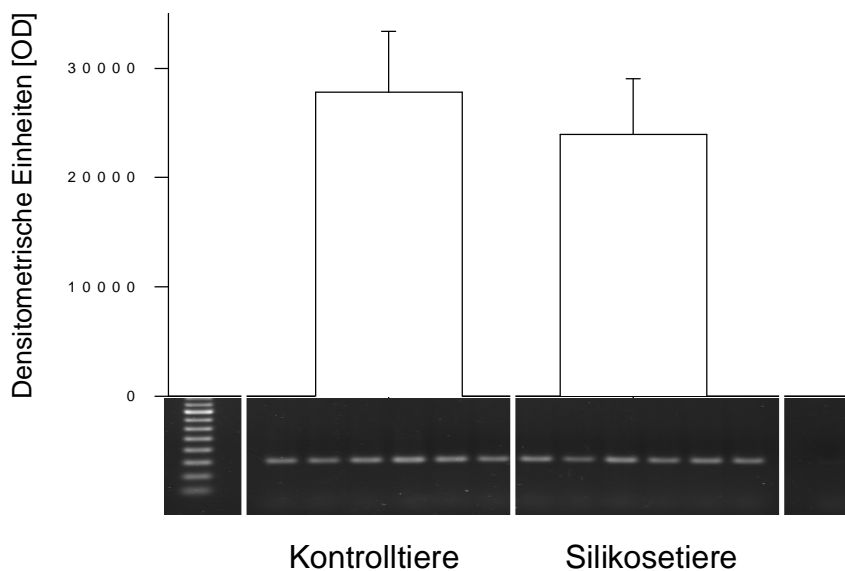


Abb. 25: MIP-2-mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 35 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der OD $\pm$ SD für jeweils 6 Tiere.

### 3.3.6.2. Expression der MIP-2-mRNA in den Lungenpopulationen

Auch für dieses Chemokin war es von Bedeutung, ob durch Analyse der zwei Zellpopulationen der Lunge eine unterschiedliche mRNA-Expression in verschiedenen Gewebeanteilen evident wird.

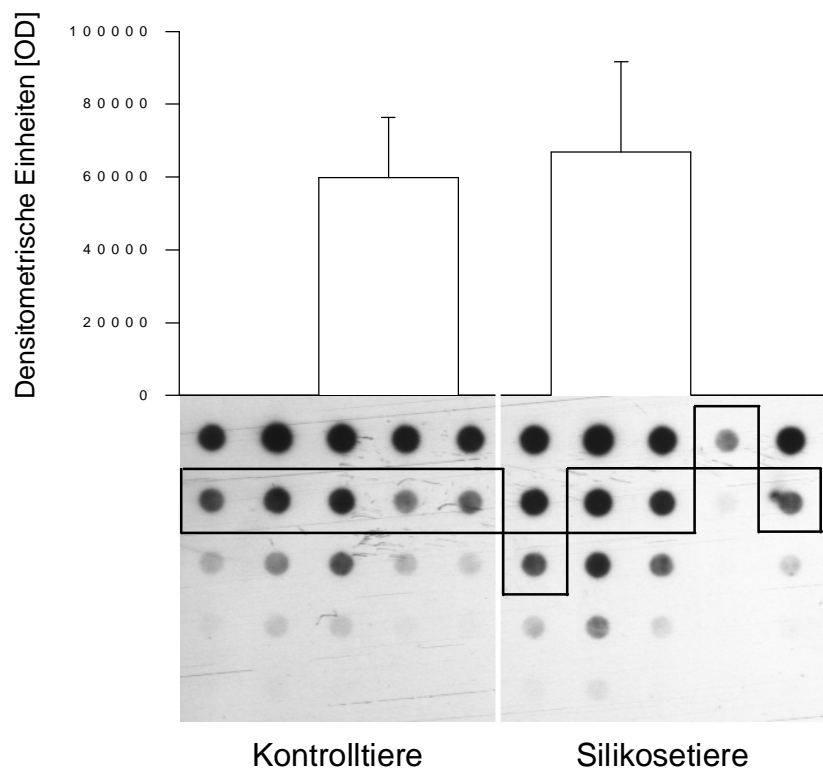


Abb. 26: MIP-2-mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

Es fanden sich jedoch weder im untersuchten belüfteten Kompartiment (Abb. 26) noch im Interstitium (Abb. 27) signifikante Unterschiede in der Expression von MIP-2 mRNA.

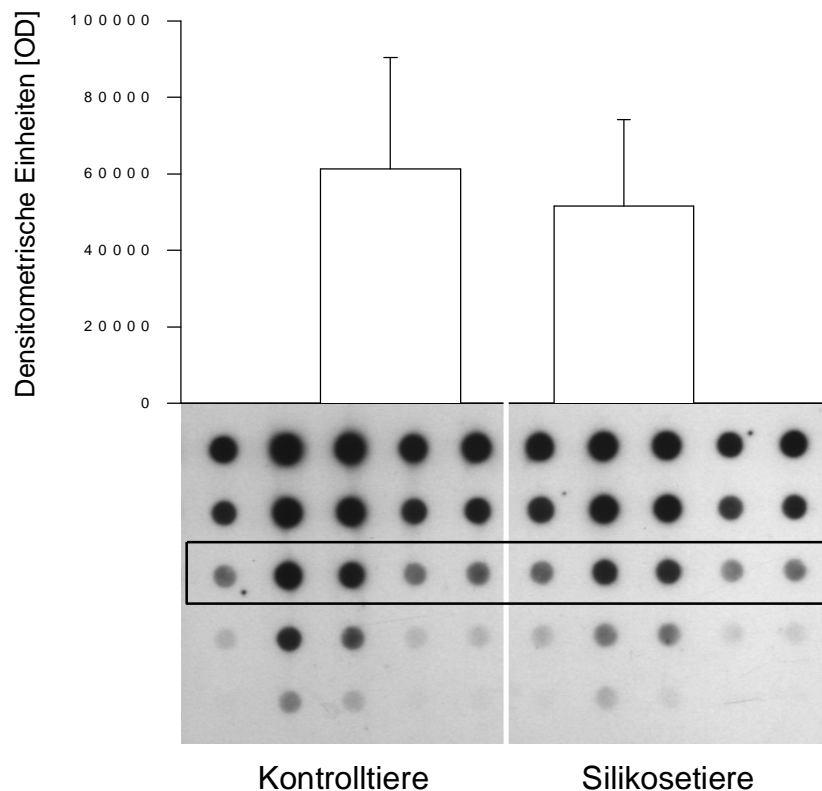


Abb. 27: MIP-2-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 28 Zyklen, Dot-Blot nach 18, 20, 22, 24, 26 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

### 3.3.6.3. Expression der GRO- $\alpha$ -mRNA in der Gesamtlunge

Zu den ELR-Motiv-tragenden CXC-Chemokinen gehört auch das GRO- $\alpha$ .

Im standardisiertem Verfahren wurde die mRNA-Expression von GRO- $\alpha$  in der Gesamtlunge ermittelt. In Abbildung 28 sieht man die Ergebnisse der PCR aus cDNA der Gesamtlunge, die für eine gleiche hohe mRNA-Expression in silikotischen und gesunden Tieren sprechen.



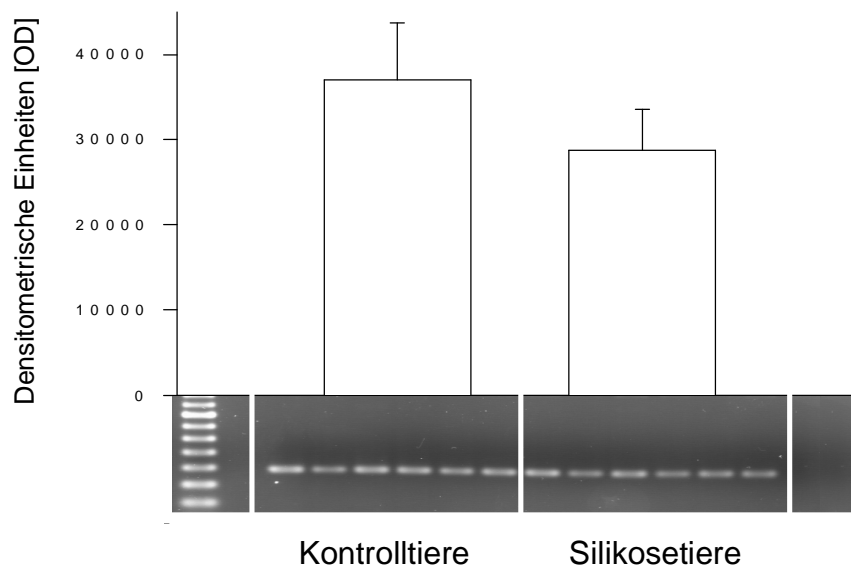


Abb. 28: GRO- $\alpha$ -mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der OD $\pm$ SD für jeweils 6 Tiere.

#### 3.3.6.4. Expression von GRO- $\alpha$ -mRNA in den Lungenpopulationen

Bei Untersuchung der Zellen aus der BAL und der interstitiellen Population auf die Expression des GRO- $\alpha$ -Genes ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

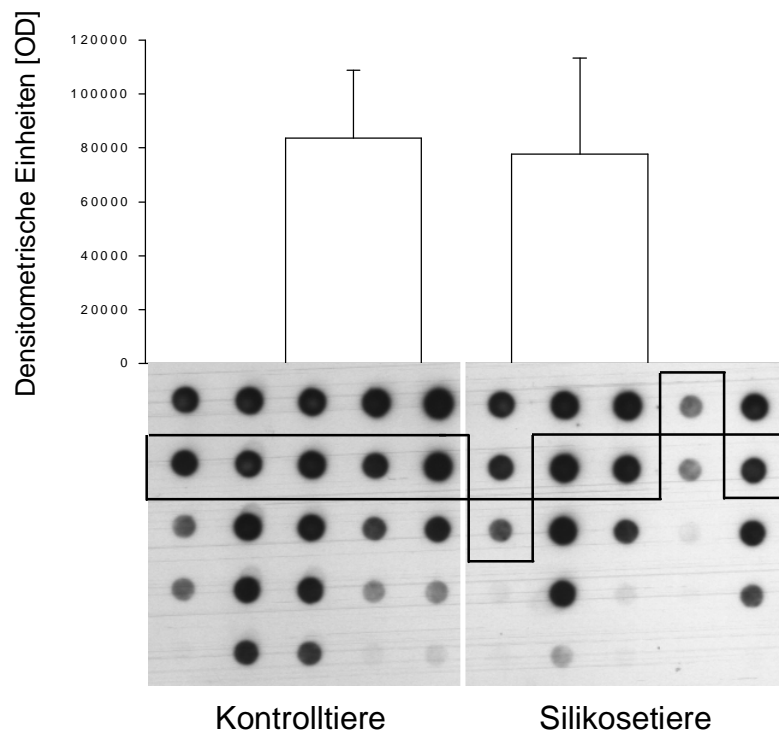


Abb. 29: GRO- $\alpha$ -mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft. (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

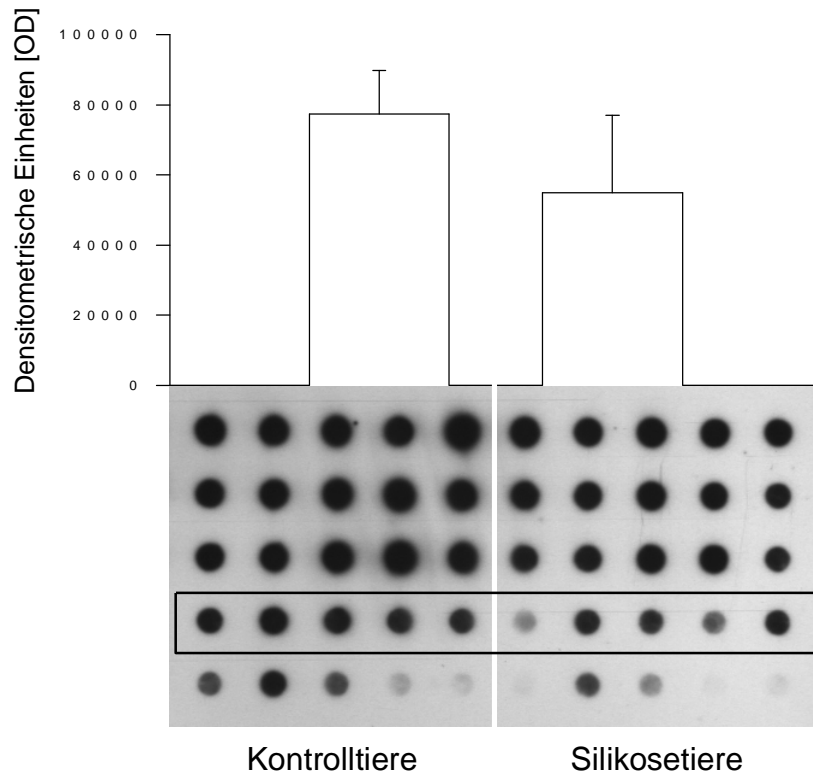


Abb. 30: GRO- $\alpha$ -mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

### 3.3.7. Untersuchung von iNOS im Tiermodell der chronischen Silikose

Pathologische Wirkungen durch  $\alpha$ -Christobalit in der Lunge sind nach der Theorie von Blackford (1997) zur Pathogenese der Silikose an das Entstehen freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale gekoppelt. Da solche Radikale durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) vermehrt produziert werden, wurde in dem in dieser Arbeit zugrundeliegenden Tiermodell die Expression der iNOS-mRNA untersucht.

### 3.3.7.1. Expression der iNOS-mRNA in der Gesamtlunge

Entgegen den Erwartungen fand sich im Homogenat der Gesamtlunge kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression von iNOS, wenn auch der Durchschnittswert in silikotischen Tieren erhöht war (Abb. 31).

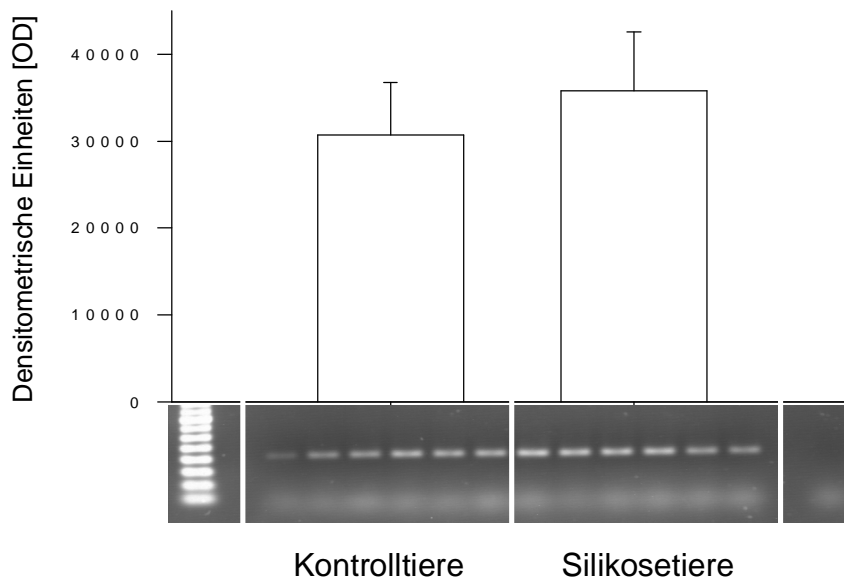


Abb. 31: iNOS-mRNA-Expression in der Gesamtlunge, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 33 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  für jeweils 5 Tiere.

### 3.3.7.2. Expression der iNOS-mRNA in den Lungenpopulationen

Der Alveolarraum wird bei der Silikose von reaktiv veränderten Makrophagen ausgefüllt. Diese Zellen sind prinzipiell in der Lage, iNOS zu exprimieren und dadurch eine erhöhte Anzahl an reaktiven Sauerstoffspezies zur Abwehr gegen Fremdpartikel zu generieren.

In Zellen aus dem Alveolarraum und den Bronchien war im Gegensatz zur Gesamtlunge die Expression von iNOS-mRNA in  $\alpha$ -Christobalit-exponierten Tieren signifikant erhöht. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 dargestellt.

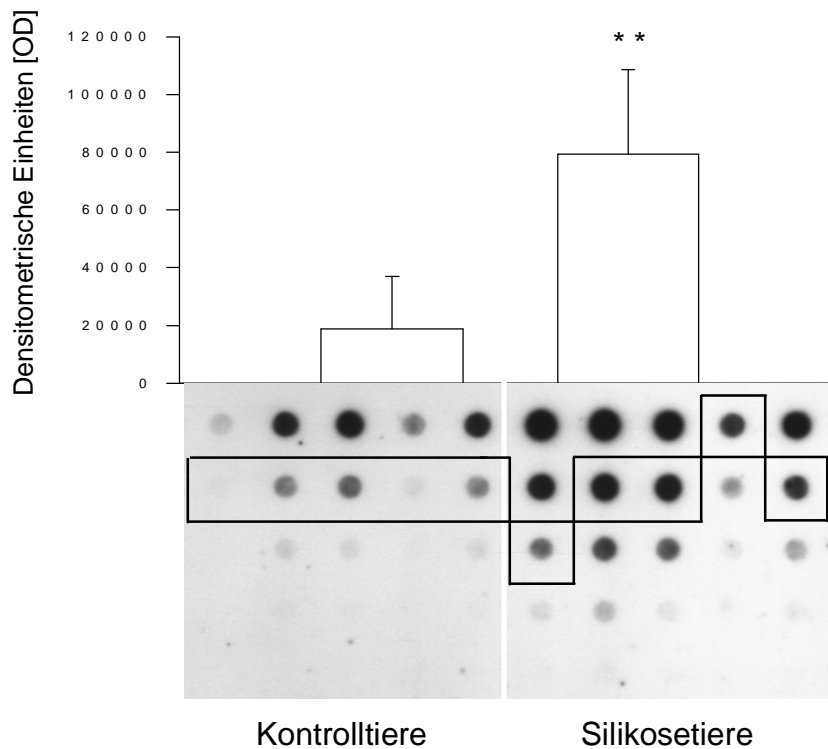


Abb. 32: iNOS-mRNA-Expression in Zellen aus der BAL, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 33 Zyklen, Dot-Blot nach 21, 23, 25, 27, 29 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

Im Interstitium der silikotischen Lungen wäre ebenfalls eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase zu erwarten. Die PCR-Analyse erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Menge an nachweisbarer iNOS-mRNA zwischen den kranken und gesunden Tieren (Abb. 33).

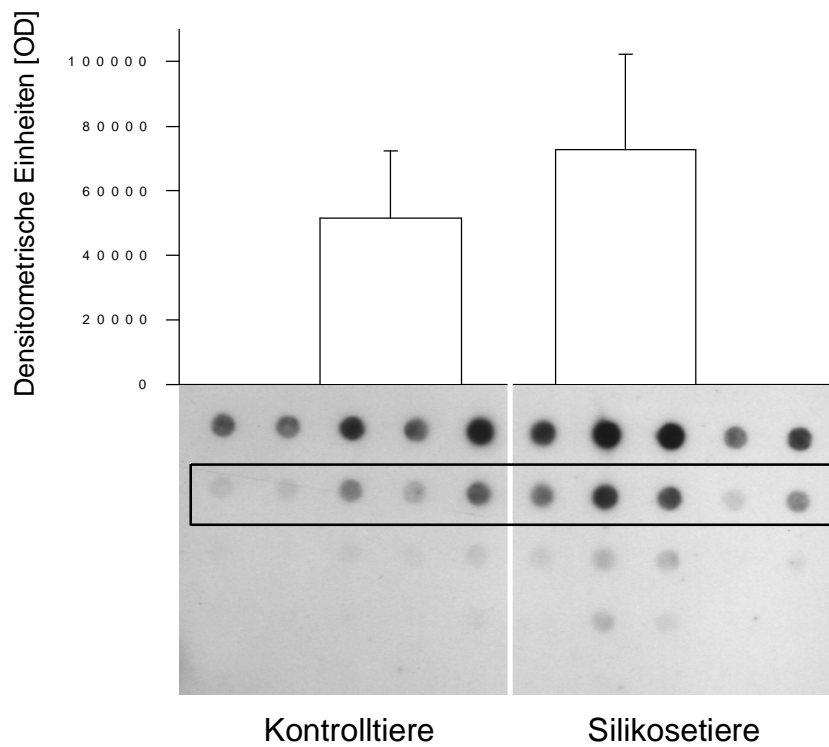


Abb. 33: iNOS-mRNA-Expression in der interstitiellen Zellpopulation, 12 Monate nach Exposition gegenüber  $\alpha$ -Christobalit-Aerosol bzw. Trägerluft (PCR mit 30 Zyklen, Dot-Blot nach 20, 22, 24, 26, 28 Zyklen). Die Graphik zeigt die Auswertung der  $OD \pm SD$  der umrahmten Punkte, d.h. für jeweils 5 Tiere.

## 4. Diskussion

Die Inhalation anorganischer Stube über einen längeren Zeitraum bzw. über eine bestimmte kumulative Dosis hinaus kann zu einem fibrotischen Umbau des Lungengewebes, einer Pneumokoniose, führen (Rubin und Farber, 1994). Für die Entstehung der Silikose sind Siliziumdioxidverbindungen verantwortlich, die bei Bearbeitung von Steinen, aber auch in der Glas- und Keramikindustrie freigesetzt werden (Thurlbeck, 1987).

Für die Pathogenese der Erkrankung wurden erst in den letzten 20 Jahren zunehmend Veränderungen immunologischer Parameter erforscht. Die Alveolarmakrophagen spielen als potente „Freizellen“ an der Grenze zwischen Atemluft und Lungengewebe für den Schutz des Organismus vor Fremdpartikeln eine wesentliche Rolle (Lohmann-Matthes, 1994). Ursprünglich wurde angenommen, daß phagozytierte Partikel die Makrophagen von innen zerstören (Allison, 1966), die Partikel dabei erneut freigesetzt und dann wieder von Makrophagen phagozytiert werden. Diese kontinuierliche Zerstörung von Zellen sollte nach dieser Theorie zu einer dauerhaften Freisetzung gewebsschadigender Enzyme und dadurch zu einer chronischen Entzündung und fibrotischen Reaktion führen. In vitro führt eine Inkubation humaner Makrophagen mit SiO<sub>2</sub> tatsächlich zur Apoptose, dem programmierten Zelltod (Iyer et al., 1996). Werden allerdings die Partikel mit Serumproteinen oder Surfactant beschichtet, kann dieser Zelltod in vitro (Wallace et al., 1995) nicht mehr beobachtet werden. In vivo werden die Partikel mit Bestandteilen des Surfactantsystems beladen und dadurch zelluläre Reaktionen deutlich abgeschwächt (Antonini und Reasor, 1994).

Trotzdem kommt es zu einer Aktivierung von Makrophagen. So konnten Mohr et al. (1991) in ex vivo-Untersuchungen nach einem zusätzlichem LPS-Reiz eine vermehrte Freisetzung des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  aus Alveolarmakrophagen silikotischer Ratten im Vergleich zu Makrophagen aus Kontrolltieren beobachten.

Kane postuliert neben einer Aktivierung der Makrophagen auch eine veränderte Makrophagenfunktion bei der Silikose (Kane, 1994).

Aber nicht nur die Makrophagen treten in Kontakt mit den Partikeln, sondern auch andere Zellen der Lunge, und es resultiert ein komplexes Zusammenspiel zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen.

#### **4.1. Tiermodell**

Die Untersuchung einer Pneumokinose im Tiermodell bietet entscheidende Vorteile gegenüber der Forschung am Menschen. Gerade bei der Silikose werden die Patienten erst im chronischen Stadium symptomatisch, und Erkenntnisse über Vorgänge, die zu diesem Stadium führen, sind schwer zu erhalten. Außerdem lassen sich im Tiermodell die Parameter Dosis, Dauer und Art der Exposition genau festlegen und somit die Auswirkungen von Veränderungen dieser Parameter präzise untersuchen.

Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten, Siliziumdioxid-Partikel in die Atemwege einzubringen. Bei der Inhalation ist das Trägermedium Luft, und es wird eine physiologische Exposition simuliert. Man kann aber auch Flüssigkeit als Träger verwenden, diese Form der Exposition wird dann als Instillation bezeichnet. Dabei entgehen jedoch die Partikel der mukoziliären Reinigung durch das Flimmerepithel der größeren Atemwege und gelangen gleich in tiefere Lungenabschnitte. Letztlich ist entscheidend, wie viele Partikel in den Alveolen ihre Wirkung entfalten. Zur Auslösung einer akuten Silikose mit einer hohen Beladung der Lunge mit Staubbestandteilen sind beide Methoden vergleichbar (Henderson et al., 1995).

In dem von uns untersuchten Rattenmodell einer chronisch unkomplizierten Silikose, die sich nach einer niedrig dosierten Exposition entwickeln kann, ist jedoch die Inhalation die geeignetere, da physiologische Methode.

Ein Vorteil der Untersuchungen an der Ratte im Gegensatz zu anderen Nagetieren besteht darin, daß die Lunge der Ratte anatomisch der des Menschen ähnelt, und Partikel mit 3 µm Durchmesser noch bis in die Alveolen gelangen (Popesko et al., 1992). Daher sind Untersuchungsergebnisse solcher tierexperimenteller Studien leichter auf die Situation beim Menschen übertragbar.



## 4.2. Die untersuchten Zellpopulationen der Lunge

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression zellmobilitätsrelevanter Zytokine sowohl an Gesamtlungen- als auch an isolierten Zellpopulationen aus der Lunge untersucht. Im folgenden Abschnitt soll diskutiert werden, welche Zellen potentiell zu Veränderungen in der Expression der analysierten Zytokine beitragen können.

Die Lunge besteht aus mehr als 40 verschiedene Zelltypen (Mason et al., 1976). Das Lungengerüst wird von Bindegewebszellen, den Fibroblasten, und der von ihnen produzierten extrazellulären Matrix gebildet. Diese besteht sowohl aus kollagenen als auch elastischen Fasern, wobei Fibronectin und Vitronectin die Zellen mit der Extrazellulärmatrix vernetzen (Johansson et al., 1997).

Über eine große morphologische Variabilität verfügen die oberflächen- auskleidenden epithelialen Zellen der Lunge, die in den zuleitenden Atemwegen der Trachea und Bronchien Zilien tragen und deshalb Flimmerepithel genannt werden. In den distalen Atemwegen bedecken die Typ-I-Pneumozyten, die den Gasaustausch mit dem Blut ermöglichen, etwa 96 % der Oberfläche. Die nach Lehnert et al. (1985) etwa 11 % der Gesamtlungenzellzahl darstellenden Typ-II-Pneumozyten bilden nur 4 % der Oberfläche der Alveolen. Sie produzieren Surfactant und sind in der Lage, bei Schädigung der Typ-I-Pneumozyten diese durch Proliferation und anschließende Differenzierung zu ersetzen (Finkelstein, 1994).

Des weiteren finden sich natürlich auch Zellen der Blut- und Lymphgefäße, Knorpelzellen und sekret-produzierende Zellen in der Lunge.

Wesentlich für die Ausbildung der Silikose ist die Aktivierung immunkompetenter Zellen. Bei diesen kann man zwischen den in Blutgefäßen befindlichen, zirkulierenden und den ortstständigen Zellen unterscheiden. Dabei nehmen die Makrophagen in der Lunge entscheidende Aufgaben der Immunabwehr wahr. Insgesamt kommen vier Arten von Makrophagen in der Lunge vor, die alveolaren, interstitiellen, intravaskulären Makrophagen und die dendritischen Zellen (Lohmann-Matthes et al., 1994).

Die interstitiellen Makrophagen teilte van der Brugge-Gamelkoorn et al. (1985) anhand ihres Färbeverhaltens gegenüber den Antikörpern ED1 und ED2 noch in zwei Untergruppen ein, die pulmonalen Gewebsmakrophagen und die Makrophagen im Bronchus-assoziierten Lymphgewebe (BALT). Von Holt et al. (1993), Gong et al. (1992) und Nelson et al. (1994) wurden die dendritischen Zellen im Epithel der großen Atemwege der Ratte beschrieben, die vor allem auf Antigenpräsentation spezialisiert sind (Lohmann-Matthes et al., 1994).

Über den Anteil der ansässigen Makrophagen an der Gesamtzellzahl der Lunge existieren kontroverse Daten. Nach Lehnert et al. (1985) sind 3-5 % der Lungenzellen Alveolarmakrophagen, 2 % sind interstitielle Makrophagen, und circa 8 % sind polymorphkernige Granulozyten (PMN). Nach seinen Daten und denen von Pinkerton et al. (1982), Davis et al. (1978), Crapo et al. (1983) sind demnach in der Ratte 15-40 % der pulmonalen Makrophagen im Interstitium lokalisiert. Bei der Maus sind jedoch nur 7 % der pulmonalen Makrophagen im Interstitium ansässig (Blusse und van Furth, 1979). Für den Menschen existieren keine verlässlichen Daten, jedoch ähnelt die Komposition alveolarer Zellen des Menschen denen der Fischer 344-Ratte (Crapo et al., 1983).

Diese Zusammensetzung ist wichtig für die Beurteilung der PCR-Untersuchungen an Zellen aus der Gesamtlunge, wobei zu berücksichtigen ist, daß vor allem peripher liegendes Lungengewebe verarbeitet und große Bronchien gezielt entfernt wurden. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine gründliche Spülung über den rechten Ventrikel das Blut aus dem Gewebe entfernt. Nach Blusse und van Furth (1978) stellt eine derartige Perfusion der Lunge eine effektive Methode dar, das Gewebe von Blut-Monozyten, -Lymphozyten und -Granulozyten zu befreien.

Die Aufzählung der in der Lunge enthaltenen Zellen verdeutlicht aber die Schwierigkeit einer verlässlichen Interpretation der PCR-Ergebnisse aus dem Gesamtgewebe. Aus diesem Grund wurden Zellen aus zwei Kompartimenten der Lunge, nämlich dem belüfteten und dem interstitiellen isoliert. Für die Präparation wurde eine, in unserem Labor bereits genutzte, Methode nach Amann (1996) angewandt.

Die BAL isoliert Zellen, die im Bronchoalveolarraum vorkommen. Das sind zu einem großen Anteil Makrophagen, aber darüber hinaus kommt es auch zum Ablösen einiger Typ-II-Pneumozyten, Zilienepithelien, Lymphozyten und Granulozyten. Lavnikova et al. (1993) fand in der BAL eine Verunreinigung mit 2 % Typ-II-Pneumozyten. Nach Lehnert et al. (1985) enthält eine ebenso gewonnene BAL 5-15 % Flimmerepithel, 57-87 % Alveolarmakrophagen und einige PMN. Struhar et al. (1989) erhielten durch eine 5x mit je 10 ml durchgeführte Lavage 93 % Alveolarmakrophagen, 4 % Neutrophile und 2 % Lymphozyten. Nach Amann (1996) sind 96 % der durch BAL isolierten Zellen Alveolarmakrophagen, 3,3 % Neutrophile und 0,3 % Lymphozyten.

In der aus Zellen der BAL isolierten RNA konnte Surfactant-Protein-C mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden (eigene Daten, nicht gezeigt). Das spricht dafür, daß auch in der von uns durchgeführten Lavage Typ-II-Pneumozyten enthalten waren.

Für eine effiziente Gewinnung alveolarer Zellen ist es wichtig, eine intensive Bronchoalveolare Lavage mit kleinen Mengen an Flüssigkeit unter Gewebsmassage durchzuführen. In Übereinstimmung mit Arbeiten von Lavnikova et al. (1993) und Dethloff et al. (1985) können mit 18 aufeinanderfolgenden Lavagen mit je 6-7 ml etwa 95 % der Alveolarmakrophagen aus der Lunge von Ratten entfernt werden. Diese auch von uns durchgeführte, möglichst vollständige Lavage der alveolaren Zellen minimiert eine Verunreinigung der sich anschließenden Präparation interstitieller Zellen mit Alveolarmakrophagen.

Die interstitiellen Makrophagen unterscheiden sich von den Alveolarmakrophagen sowohl morphologisch als auch funktionell (Lohmann-Matthes et al., 1994). Sie sind kleiner, haben ihre Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns verschoben und erinnern phänomenologisch an Blutmonozyten (Lavnikova et al., 1993). Die Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose ist nach Lavnikova und nach Lehnert et al. (1985) in beiden Populationen gleich stark ausgeprägt. Wizeman und Laskin (1994) inkubierten interstitielle Makrophagen aus der Ratte mit LPS und fanden im Vergleich zu Alveolarmakrophagen eine gesteigerte Phagozytose opsonierter Erythrozyten,

eine stärkere Chemotaxis auf C5a und eine höhere Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

Interstitielle Makrophagen exprimieren vermehrt MHC-II-Moleküle an der Oberfläche und sind über diesen Mechanismus wichtiger Bestandteil der spezifischen Immunabwehr, stellen sozusagen nach den Alveolarmakrophagen eine zweite Abwehrfront dar (Lohmann-Matthes et al., 1994).

Es ist methodisch schwierig, interstitielle Makrophagen möglichst vollständig und rein zu gewinnen. Die Zellen werden meist über eine Kombination aus enzymatischen Verdau und mechanischer Zerkleinerung aus dem Stützgewebe isoliert. Dabei arbeiten einige Forschergruppen mit einer Kombination aus Kollagenase- und DNase-Verdau mit eventuell anschließender Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Holt et al., 1985; Lavnikova et al., 1993, Johansson et al., 1997).

In unserer Arbeitsgruppe basierte die Isolation interstitieller Zellen auf einem Protokoll nach Dobbs et al. (1986) zur Isolation von Typ-II-Pneumozyten.

Die Anwendung der Elastase ermöglicht eine sehr effektive Freisetzung der Zellen aus ihrem Gewebsverband und der Extrazellulärmatrix. Durch den Verdau des Gewebes mit Elastase und DNase, mechanische Zerkleinerung und Filterung wurde eine Einzelzellsuspension erhalten. Diese wurde im Protokoll nach Dobbs auf eine IgG-beschichtete Platte gegeben, an die sämtliche Fc-Rezeptor-tragenden Zellen, wie z.B. Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Mastzellen gebunden wurden. Etwa 30-40 % der Zellen verfügten über keinen derartigen Rezeptor und ließen sich als Typ-II-Pneumozyten charakterisieren.

In unseren Versuchen wurde ebenfalls ein Verdau mit Elastase und DNase angewandt. Dann schloß sich jedoch keine weitere Adhärenz oder Aufreinigung der Zellen an, um eine Aktivierung der Zellen zu vermeiden, sondern es wurde direkt die RNA isoliert. Nach Daten von Amann (1996) bestand die so gewonnene Zellpopulation aus Zellen, die zu 88 % für unspezifische Esterase positiv und zu 52 % für ED1 positiv reagierten. Es ist davon auszugehen, daß unsere Präparation der interstitiellen Zellen zu ca.

60-70 % aus Makrophagen, zu 30-40 % aus Typ-II-Pneumozyten, zu 10-15 % aus Granulozyten und zu 3 % aus Lymphozyten bestand.

Gegenstand umfangreicher Forschung ist die Frage nach dem Ursprung der pulmonalen Makrophagenpopulationen. Prinzipiell können sie entweder in der Lunge proliferieren oder über das Blut einwandern. Im Gewebe befindliche Makrophagen können aber auch dort durch migrationshemmende Faktoren gehalten werden. Für die beiden erst genannten Theorien gibt es entsprechende Untersuchungsergebnisse.

Für murine (Chen et al., 1988) und humane (Golde et al., 1974) Alveolarmakrophagen konnte in vitro gezeigt werden, daß sie auf Wachstumsfaktoren wie GM-CSF mit Proliferation reagieren. Interstitielle Makrophagen proliferieren in Kultur auch ohne zusätzliche Reize, wobei dies möglicherweise auf eine Kontamination mit CSF-sezernierenden Zellen zurückgeführt werden kann (Lohmann-Matthes et al., 1994). Bei Patienten mit Sarkoidose bzw. idiopathischer pulmonaler Fibrose konnten Pforte et al. (1993) proliferierende Alveolarmakrophagen in der BAL nachweisen.

Andererseits tritt z.B. nach Kohle-Instillation ein Anstieg der Alveolarmakrophagen in der BAL bereits einen Tag nach Exposition auf, der aufgrund der Kinetik und Intensität nicht auf Proliferation ortsständiger Zellen beruhen kann (Lohmann-Matthes et al., 1994). Für eine mögliche Rekrutierung der Alveolarmakrophagen aus den Blutmonozyten sprechen auch noch weitere Faktoren. Erstens stellen die interstitiellen Makrophagen, nachgewiesen für die Ratte, eine morphologische Zwischenstufe mit separatem Funktionsprofil zwischen Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen dar (Chandler et al., 1986; Sebring und Lehnert, 1992). Zweitens ist es van Furth und Sluiter (1986) gelungen, den Übertritt von Makrophagen aus dem Interstitium in die Alveolen bei der Maus nachzuweisen. Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß sich Lungenmakrophagen durch eine Einwanderung aus dem Blut und in geringerem Umfang durch eine lokale Proliferation rekrutieren (Lohmann-Matthes et al., 1994). Die Mechanismen, die zur Einwanderung von Zellen in die Lunge und den Alveolarraum führen, wurde bisher nur wenig untersucht.

Eine weiteres Prinzip, das eine Zunahme an Zellen in der Lunge zur Folge hat, ist die Hemmung der Zellbewegung und damit die Verhinderung der Abwanderung von Zellen aus dem Gewebe.

#### **4.3. Veränderung der Zellzusammensetzung in der Lunge nach Inhalation von Christobalit**

Nach einer achttägigen Inhalationsexposition von Ratten gegenüber Christobalit fanden Absher et al. (1989) einen kontinuierlichen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der Makrophagen und der Lymphozyten im Alveolarraum. Nach 8-10 Wochen ging die Zellzahl zurück, um in der 24. Woche nach Exposition erneut anzusteigen. Dieser zweiphasige Verlauf der vermehrten Infiltration der Lunge mit Zellen des Immunsystems wurde auch durch Davis und Gemsa (1996) und in der Maus von Adamson und Bowden (1985) beschrieben.

In unserem Modell im chronischen Stadium der Erkrankung fand Amann (1996) 12 Monate p. e. eine deutliche Veränderung der Zellzusammensetzung im Alveolarraum und im Interstitium. Die absolute Zahl der durch die Präparation erhaltenen Zellen nahm bis 12 Monate p. e. auf mehr als das 10-fache zu. Der Anteil der Makrophagen in der BAL sank von 96 % auf 64 %, wobei der Prozentsatz der Neutrophilen von 3,5 % auf 33 % und der Lymphozyten von 0,5 % auf 2 % stieg (Amann, 1996).

In einem vergleichbaren, low-dose Expositionsmodell an Fischer 344 Ratten fanden Davis und Gemsa (1996) eine Erhöhung der absoluten Zahl an Makrophagen in der Lavage von  $148 \times 10^5$  auf  $1256 \times 10^5$  am Tag 200 p. e. Die Zahl der Lymphozyten stieg in der selben Untersuchung von  $3,3 \times 10^5$  auf  $283 \times 10^5$  und die der Neutrophilen von  $1,3 \times 10^5$  auf  $956 \times 10^5$ .

Auch in der Präparation der interstitiellen Zellen nahmen neben der absoluten Anzahl der gewonnenen Zellen die Anteile der neutrophilen Granulozyten (von

8,8 % auf 17,8 %) und der Lymphozyten (von 3,8 % auf 5,8 %) bei erkrankten Tieren zu (Amann., 1996).

Makrophagen und Typ-II-Pneumozyten ähneln sich in der histologischen Übersichtsfärbung, lassen sich jedoch anhand des Nachweises der unspezifischen Esterase und des ED1-Epitops unterscheiden. Unter den Zellen mit morphologischen Kriterien der Makrophagen fanden sich prozentuale Verschiebungen im Färbeverhalten zwischen silikotischen und gesunden Tieren. Die unspezifische Esterase ließ sich in nur 82 % statt 88 % der Zellen nachweisen, und lediglich 41 % statt 52 % wurden mit dem makrophagenspezifischen Antikörper ED1 detektiert (Amann, 1996). Diese Veränderung könnte zum einen auf den Verlust dieses spezifischen Oberflächenmarkers oder aber der Veränderung der Phagolysosomenmembranen bei einem Teil der Makrophagen zurückgeführt werden. Zum anderen ist es aber auch möglich, daß die aktivierten, hyperplastischen Typ-II-Pneumozyten sich leichter aus dem Zellverband lösen und deshalb in höherer Zahl in der Präparation der interstitiellen Zellen vorliegen.

Bei der chronischen Silikose kommt es also zu einer Zunahme an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Lunge, die durch die vorliegenden Arbeit erklärt werden sollen.

#### **4.4. Zytokine mit Auswirkungen auf die Mobilität der Zellen bei chronischer Silikose**

Wie in den vorangestellten Abschnitten beschrieben, gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten, die zu einer Zunahme an Zellen in der Lunge führen. Es sind die lokale Proliferation, die verstärkte Einwanderung von Zellen aus dem Blutstrom und die Hemmung der Abwanderung aus dem Gewebe. In dieser Arbeit wurde die Expression von Zytokinen in Zellen der Lunge untersucht, die Auswirkungen auf die Mobilität von Immunzellen haben.

Es gibt Faktoren, die Zellen am Ort der Entzündung halten können. Bekanntester Vertreter ist das MIF, das u.a. von Lymphozyten sezerniert wird

und die ungerichtete Bewegung der Makrophagen hemmt (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Da es bei der Silikose zu einer Ansammlung von Makrophagen in der Lunge kommt, wurde die Expression und Produktion des MIF in der chronischen Silikose untersucht.

In der immunhistochemischen Untersuchung eines silikotischen Knötchens in der Lunge zeigten sich die Alveolarmakrophagen und die Typ-II-Pneumozyten positiv für MIF (Abb. 10). Solche Granulome treten in gesunden Lungen nicht auf, so daß ein Vergleich dieser Region mittels der Immunhistochemie nicht direkt möglich war.

Für eine Untersuchung der Genexpression mittels PCR muß zur Herstellung der Primer die Sequenz des Genabschnittes bekannt sein. Da für die Spezies Ratte die Sequenz des MIF zu Beginn der Arbeiten noch nicht beschrieben war, wurde mit murinen Primern in einer cDNA aus Ratten-Milzzellen ein Produkt amplifiziert und sequenziert. Dieses zeigte eine hohe Homologie zu der murinen und der humanen Sequenz. Somit konnte davon ausgegangen werden, ein Fragment der Ratten-MIF-Sequenz vorliegen zu haben (Abb. 5a/b). Bestätigend dazu veröffentlichten Sakai et al. (1994) wenige Wochen nach Abschluß unserer Analyse die Sequenz des Ratten-MIF in der Genbank. Der Vergleich der Sequenz erbrachte Übereinstimmung mit meinen Daten. Damit war der Nachweis erbracht, durch eine PCR mit diesen Primern in einer cDNA aus Zellen der Ratte tatsächlich MIF-mRNA nachweisen zu können.

In den PCR-Untersuchungen aus den Lungenpopulationen fanden sich dann erstaunlicherweise in den Tieren mit Silikose, trotz des Vorkommens von Granulomen, in denen MIF-Protein nachweisbar war, keine erhöhte Genexpression dieses Zytokins (Abb. 11-13).

Es ist jedoch zu beachten, daß eine Vielzahl von Lungenzellen, wie z.B. das Bronchialepithel und die Typ-II-Pneumozyten, MIF produzieren können (Dr. A. Meinhardt, persönliche Mitteilung). Es ist daher nicht auszuschließen, daß bei der Silikose auch andere Zellen als die Makrophagen in ihrer MIF-Expression verändert sind. Möglicherweise erfolgt aber auch eine Regulation der Translation, die bei gleicher mRNA-Expression zu einer erhöhten Proteinmengen führen kann.



In neueren Forschungen kristallisierte sich heraus, daß MIF eine wichtige Rolle vor allem bei akuten Reaktionen im Organismus, wie z.B. beim septischen Schock, spielt (Bucala, 1994). Auch beim ARDS werden in der BAL von erkrankten Patienten erhöhte Spiegel an MIF detektiert (Donnelly et al, 1997; Donnelly und Bucala, 1997). Dabei steigert MIF die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-8 und ist in der Lage, die protektive Wirkung von Glukokortikoiden aufzuheben. Anti-MIF-Ak können in diesem Modell den fulminanten Verlauf des Lungenversagens verhindern.

Die hier untersuchte Silikose ist eine schleichend chronische Entzündung mit granulomatösen Veränderungen in der Lunge, die wahrscheinlich nicht durch MIF mitverursacht werden. Agnes Kane (1994) erklärt die Ausbildung von Granulomen damit, daß die Makrophagen nach Phagozytose membranständiges IL-1 $\beta$  (Hogquist, et al., 1991; Dinarello und Wolff, 1993) und Fibronectin (Wagner et al., 1982) anstelle der löslichen Formen produzieren und damit Fibroblasten anlocken, die an die Makrophagen binden und diese vernetzen. Es resultiert eine, an Größe zunehmende, lokale Ansammlung von Makrophagen. Andererseits finden sich auch in den thorakalen Lymphknoten Makrophagen mit inkorporierten Siliziumdioxid-kristallen (Friedetzky, 1997). Es ist anzunehmen, daß partikeltragende Makrophagen dorthin ausgewandert sind. Eventuell können die Partikel aber auch über die Lymphwege dorthin transportiert und erst im Lymphknoten phagozytiert worden sein. Die Clearance der Partikel aus der Lunge war jedoch nicht primäres Ziel der Untersuchungen, sondern die Mechanismen, die eine veränderte Zellzusammensetzung in der Lunge verursachen.

#### **4.4.1. Rekrutierung von Zellen in die Lunge bei chronischer Silikose**

Die veränderte Zellzusammensetzung bei Silikose ließ sich durch eine Hemmung der Abwanderung durch MIF nicht erklären. Deshalb wurde die Expression einiger Chemokine untersucht, die eine Einwanderung von Immunzellen in die Lunge regulieren können. Die vorliegenden Ergebnisse liefern Aussagen über die Expression der Gene, wobei für die meisten

Chemokine die Menge ihrer mRNA mit der Translation und damit Produktion von Protein korreliert (Baggiolini et al., 1994).

Die **Zunahme an Makrophagen** im Alveolarraum und im Interstitium bei der Erkrankung an Silikose wird nach meinen Daten unter anderem über die CC-Chemokine MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  vermittelt.

Die mRNA des monozytenanlockenden Chemokins MCP-1 wird in der Gesamtlunge von Silikotieren signifikant höher exprimiert als in den Kontrolltieren (Abb. 14). Dabei ist interessant, daß sich die Expression des MCP-1 in Zellen der BAL und des Interstitiums zwar tendenziell ähnlich wie in der Gesamtlunge darstellt, aber in diesen Zellpräparationen zwischen den Silikotieren und den Kontrolltieren kein statistisch signifikanter Unterschied mehr besteht (Abb. 17 und Abb. 18). Daraus stellt sich die Frage, welche Zellen zu der erhöhten MCP-1 Expression bei der Silikose beitragen.

Zhang et al. (1994) untersuchten die Expression und Produktion von MCP-1 in Fischer 344 Ratten nach Bleomycininstillation, also in einem experimentellen Vergleichsmodell zur Silikose. Für die über 20 Tage anhaltende gesteigerte Synthese von MCP-1 stellten sich die eosinophilen Granulozyten in diesem Fibrosemodell als hauptproduzierende Zellen heraus. Aber auch Monozyten, einige reaktive Fibroblasten und Epithelzellen exprimierten MCP-1 mRNA. Bei der chronischen Silikose findet man jedoch keine Zunahme an Eosinophilen in der Lunge, so daß die andere Zellen als Produzenten vorrangig in Frage kommen. Sakanashi et al. (1994) fanden in Tierversuchen der Bleomycin-induzierten Fibrose einen deutliche Anstieg der Makrophagenanzahl in der Lunge, wobei die Alveolarmakrophagen am 3. Tag p. e. und die interstitiellen Makrophagen hingegen erst nach 2 Wochen einen Peak erreichten. Die MCP-1 mRNA Expression in der Gesamtlunge war bereits 1 Tag nach Instillation maximal. Diese Arbeitsgruppe wies mittels Immunhistochemie MCP-1 in den Makrophagen und PMN nach. Die Alveolarmakrophagen können MCP-1 produzieren, allerdings läßt sich diese mRNA nicht durch LPS induzieren (Strieter et al., 1989, Becker et al., 1994).

Würden die Hauptquellen der MCP-1 Expression bei der Silikose die Alveolar- oder interstitiellen Makrophagen sein, wäre auch in den Zellen der BAL und

des Interstitiums ein signifikanter Unterschied in der mRNA Expression für dieses Chemokin zu erwarten. Wie in den Abb. 17 und 18 zu sehen, ist der Unterschied in der MCP-1 Expression in den isolierten Zellpopulationen zwischen Kontroll- und Silikatieren jedoch nicht signifikant.

Aus diesen Gründen kommen auch andere Zellen wie Pneumozyten und Fibroblasten als potentielle MCP-1 Produzenten bei der chronischen Silikose in Betracht. In Überständen der humanen Typ-II-Pneumozyten Zelllinie A549 konnte eine chemotaktische Aktivität für Makrophagen beobachtet werden, die sich auf eine konstitutive Expression von MCP-1, TGF- $\beta$  und Leukotrien B<sub>4</sub> zurückführen ließ (Koyama et al., 1997). Standiford und Kollegen (1990 und 1991) zeigten außerdem, daß in diesen Zellen durch eine Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  oder IL-1 die Expression von IL-8 und MCP-1 ausgelöst werden konnte. Paine et al. (1993) wiesen erstmals ex vivo in Typ-II-Pneumozyten aus der Ratte die Expression und Produktion von MCP-1 nach. Yamamoto et al. (1998) kultivierten Zellen des Epithels der Trachea und der Bronchien aus Ratten und fanden eine konstitutive Sekretion von MCP-1 durch diese Zellen. Nach diesen Daten kann davon ausgegangen werden, daß die Epithelzellen auch in vivo wesentlich zu einer Chemokinproduktion in der Lunge beitragen und diese durch verschiedene Reize induzierbar ist.

Bestätigend dazu fanden Boitelle et al. (1997) in Patienten mit Kohle-Pneumokoniose (coal worker's pneumokoniosis) bzw. progressiver massiver Fibrose erhöhte MCP-1 Proteinmengen in der BAL. Die kultivierten Alveolarmakrophagen aus diesen Patienten setzen vermehrt, aber nicht signifikant erhöhte Spiegel an MCP-1 in die Kulturmedien frei und tragen demnach nur partiell zu der MCP-1 Produktion bei. Mittels Immunhistochemie ließ sich bei Patienten mit Lungenfibrose eine gesteigerte Signalintensität für MCP-1 in hyperplastischen Typ-II-Pneumozyten, in Fibroblasten und in den in der Anzahl erhöhten Alveolarmakrophagen nachweisen. In den Lungengewebe gesunder Probanden zeigten sich lediglich einige wenige Alveolarmakrophagen, vereinzelte Typ-II-Pneumozyten und perivaskuläre glatte Muskelzellen positiv für MCP-1.

Auch in humanen Fibroblasten kann in vitro die Synthese von MCP-1 mRNA induziert werden (Strieter et al., 1989, Yoshimura und Leonard, 1990). Lukacs

et al. (1994) isolierten Fibroblasten aus Granulomen in der Leber von Mäusen, die durch Eier des Parasiten *Schistosoma mansoni* induziert worden waren. Diese Fibroblasten zeigten im Gegensatz zu denen aus gesunden Tieren in vitro eine permanente Produktion von MCP-1, ohne daß ein zusätzlicher Stimulus nötig war. Dieses veränderte Profil der Zytokinfreisetzung erklärt möglicherweise die persistierende Entzündung. Zu der MCP-1 Expression bei der chronischen Silikose tragen demnach neben den Makrophagen auch die Pneumozyten und Fibroblasten wesentlich bei. Darüber hinaus konnte Gharaee-Kermani et al. (1996) in kultivierter Lungenfibroblasten aus der Ratte eine dosisabhängige Induktion der Kollagensynthese in diesen Zellen durch MCP-1 nachweisen.

Das CC-Chemokin MIP-1 $\alpha$  wirkt ebenfalls chemotaktisch auf Makrophagen (Standiford et al., 1993), darüber hinaus auch auf neutrophile Granulozyten (Wolpe et al., 1988) und Lymphozyten (Taub et al., 1993), worauf aber erst später eingegangen werden soll. Es wird ebenso wie MCP-1 in Zellen der Gesamtlunge silikotischer Tiere verstärkt exprimiert (Abb. 19). Interessant ist die proliferierende Wirkung, die MIP-1 $\alpha$  allein oder stärker in Kombination mit GM-CSF auf Peritonealmakrophagen entfaltet (Fahey et al., 1992). Somit könnte MIP-1 $\alpha$  ein Faktor sein, der zu der bei Patienten mit IPF beobachteten Proliferation von Alveolarmakrophagen beiträgt (Pforte et al., 1993).

Wie auch für MCP-1 beobachtet, ist die Expression von MIP-1 $\alpha$  in den isolierten Lungenzellpopulationen silikotischer Tiere nicht signifikant verschieden von vergleichbaren Zellpräparationen aus Kontrolltieren (Abb. 20/21). Die erhaltenen Ergebnisse spiegeln lediglich die Tendenz der Resultate der Untersuchungen an aus Gesamtlunge isolierter RNA wider.

Auch das MIP-1 $\alpha$  kann von einer Vielzahl an Zellen produziert werden. In Patienten mit Lungentumoren und gesunden Kontrollprobanden wiesen Konishi und Mitarbeiter (1996) das Protein in Alveolarmakrophagen, Bronchialepithel, hyperplastischen Typ-II-Pneumozyten und aktivierten Fibroblasten nach.

Driscoll et al. (1993a) zeigte im Rattenmodell nach Inhalation einer entzündlichen Dosis von SiO<sub>2</sub> bzw. TiO<sub>2</sub> einen Anstieg der MIP-1 $\alpha$ -, aber auch der MIP-2-mRNA in Alveolarmakrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen. In

unserem Modell der chronischen Silikose konnte im Gegensatz dazu keine gesteigerte Expression für MIP-2 (Abb. 25-27) nachgewiesen werden. Dieser Unterschied ist sicher damit zu begründen, daß die von Driscoll angewandte Exposition zu einer akuten Silikose führt, und die Reaktionen des Organismus in der akuten und chronischen Phase unterschiedlich sind.

Bei Patienten mit IPF bzw. Sarkoidose fand sich in den genannten Zellen ebenfalls eine verstärkte Produktion von MIP-1 $\alpha$  (Standiford et al., 1993), was vermuten läßt, daß diesen fibrosierenden Lungenerkrankungen möglicherweise ein der Silikose ähnliches Reaktionsmuster zugrunde liegt.

Überraschend waren die Ergebnisse zur Expression des ebenfalls für Monozyten chemotaktischen RANTES in unseren Untersuchungen. RANTES-mRNA wird bei den Tieren mit Silikose in der Gesamtlunge signifikant vermindert exprimiert (Abb. 22). In den Zellen des Alveolarraums scheint dagegen eher eine verstärkte Expression dieses Chemokins zu erfolgen (Abb. 23), während sich im Interstitium (Abb. 24) die niedrigeren RANTES-Werte der Gesamtlunge widerspiegeln.

Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von Johnston, der fibroseempfindliche Mausstämmen mit fibroseresistenten verglich und nach Bestrahlung der Lunge als auslösenden Reiz in den mit Fibrose reagierenden Mäusen erhöhte Expression von RANTES, Ip-10 und MCP-1 feststellte (Johnston et al., 1998). Petrek et al. (1997) fanden zudem in Patienten mit fibrosierender Alveolitis oder Sarkoidose eine erhöhte Bildung von RANTES, wobei immunhistochemisch gezeigt wurde, daß dafür Makrophagen und Eosinophile als produzierende Zellen verantwortlich waren. Wie jedoch schon in den vorangegangenen Ausführungen festgestellt, findet sich in unserem Modell der chronischen Silikose keine verstärkte Ansammlung von Eosinophilen im Lungengewebe. Auch Epithelzellen sind in der Lage, RANTES zu produzieren (O'Brien et al., 1998; Matsukura et al., 1998). In der Zelllinie A549 konnte die Expression von RANTES durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu induziert werden (Kwon et al., 1995). Maune und Kollegen (1997) zeigten, daß Fibroblasten des Atemtraktes von der Nasenschleimhaut bis in die Trachea RANTES exprimieren können.

Unsere Daten lassen jedoch vermuten, daß bei Silikose vor allem die Alveolarmakrophagen verstärkt RANTES exprimieren, und nicht wie für MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  auch die Pneumozyten und Fibroblasten. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden Kodama et al. (1998) in der BAL bei Patienten mit IPF signifikant erhöhte Mengen an RANTES Protein.

Es gibt darüber hinaus kaum Daten über die Rolle des RANTES bei Pneumokoniosen, vielmehr wird RANTES vor allem wegen seiner Wirkung auf eosinophile Granulozyten erforscht, die z.B. bei Asthma eine Rolle spielen.

Auch unsere Resultate bezüglich der Expression von RANTES lassen keine abschließende Einschätzung der Bedeutung dieses CC-Chemokins in der chronischen Phase der Silikose zu. Möglicherweise ist die differentielle Regulation zwischen interstitiellen Zellen und Zellen des Alveolarraumes ein Anzeichen dafür, daß RANTES eine Rolle für den Übertritt von Zellen aus dem Interstitium in den alveolaren Bereich zukommt.

Neben der vermehrten Makrophageninfiltration der Lunge bei der chronischen Silikose finden sich auch erhöhte Zahlen **neutrophiler Granulozyten** im Gewebe silikotischer Tiere (Absher et al., 1989; Davis und Gerns, 1996). Klassische Chemotaxine für neutrophile Granulozyten sind die CXC-Chemokine GRO- $\alpha$  und MIP-2 (Taub und Oppenheim, 1993). Erstaunlicherweise treten weder für MIP-2 (Abb. 25-27) noch für GRO- $\alpha$  (Abb. 28-30) in der Lunge der an Silikose erkrankten Tiere Veränderungen in der Expression auf. Der Anstieg der Neutrophilen in der BAL und im Interstitium könnte partiell auf das, auf Neutrophile chemotaktisch wirkende, MIP-1 $\alpha$  zurückgeführt werden, welches, wie in Abb. 19-21 gezeigt, verstärkt bei der chronischen Silikose exprimiert wird.

Die klassischen Chemotaxine für die neutrophilen Granulozyten spielen eventuell in der akuten Phase eine Rolle und sind möglicherweise in den anfänglichen Schädigungsprozeß nach SiO<sub>2</sub>-Inhalation involviert. Dabei ist aber zu beachten, daß es erst ab einer bestimmten Dosis zu einer derartigen akuten Reaktion kommt und die hier untersuchte chronische Silikose einen progredient schleichenden Verlauf nimmt.

In vielen Modellen einer akuten Entzündung in der Lunge, z.B. durch hohe Dosen an SiO<sub>2</sub> (Driscoll et al., 1993a), Ozonexposition (Driscoll et al., 1993b) oder LPS-Instillation (Schmal et al., 1996) kommt es zu einer Steigerung der MIP-2-Synthese in Alveolarmakrophagen und Epithelzellen und einem direkt damit korrelierendem Einstrom an PMN (Frevert et al., 1995).

Welche Faktoren bei der chronischen Silikose den Einstrom von neutrophilen Granulozyten bewirken, konnte anhand der Untersuchung der CXC-Chemokinexpression nicht geklärt werden. Durch die permanente Entzündung kommt es aber auch zur Freisetzung von Faktoren der Komplementkaskade, die, wie z.B. das C5a, chemotaktische Wirkung auf Neutrophile entfalten. Auch bestimmte Leukotriene können Granulozyten anlocken und sind möglicherweise an den beobachteten Veränderungen bei der chronischen Silikose beteiligt.

Bei der Silikose wurde eine Zunahme an **Lymphozyten** und Mastzellen in der Lunge beobachtet, deren Bedeutung für die Pathogenese noch unklar ist.

Versuche an Nacktmausmodellen haben jedoch gezeigt, daß eine fehlende oder gestörte T-Zell-Funktion zu einer milderer Fibrose nach Siliziumdioxid-Inhalation führt (Suzuki et al., 1996). Möglicherweise übernehmen die T-Lymphozyten eine regulierende Rolle bei der Ausbildung der Silikose (Smith et al., 1994).

Das ursprünglich als Monozyten-Chemotaktin beschriebene und in der silikotischen Lunge verstärkt exprimierte MCP-1 wirkt auch stark chemotaktisch auf Lymphozyten (Carr et al., 1994). Auch MIP-1 $\alpha$  hat chemotaktische Wirkung auf Lymphozyten. Interessant ist, daß die Ausbildung der Fibrose nach Bleomycininstillation durch die Gabe von Anti-MIP-1 $\alpha$ -Ak abgeschwächt werden kann. Dieser Effekt des Anti-MIP-1 $\alpha$ -Ak ist gewiß zu großen Anteilen auf die ebenfalls zu beobachtende, verminderte Makrophagenrekrutierung zurückzuführen, er könnte aber auch partiell auf der Hemmung der Lymphozyteneinwanderung beruhen (Smith et al., 1994).

Rekombinantes MIP-1 $\alpha$  induziert vor allem in humanen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten chemotaktische Mobilität (Taub et al., 1993). Das ist ein interessanter Aspekt, besonders in Zusammenhang mit der Beobachtung, daß in den drainierenden

Lymphknoten vor allem die CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation aktiviert wird (Garn et al., 1997).

**Mastzellen** konnten von Friedetzky (1997) in erhöhter Zahl im Lungengewebe von silikotischen Tieren festgestellt werden. Wiederum sind es MCP-1 (Conti et al., 1997) und MIP-1 $\alpha$  (Alam et al., 1992), die beide auch chemotaktische Wirkung auf Mastzellen haben (Alam et al., 1994). Die Bedeutung der Mastzellen für die Fibrose ist noch ungeklärt. Interessant sind jedoch Ergebnisse von Suzuki et al. (1993), die zeigten, daß in Mastzell-defizienten Mäusen eine geringere Fibrose nach SiO<sub>2</sub>-Instillation als in gesunden Tieren ausgebildet wird. Suzuki führt die verminderte Fibrosierung auf die ebenfalls eingeschränkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zurück. Möglicherweise entfalten aber auch die Mastzellen allein fibrosierende Effekte. Sie sind nämlich Produzenten von Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und Histamin, die in der Lage sind, in Fibroblasten eine Proliferation und Kollagensynthese auszulösen (Mestermann et al., 1997).

#### 4.5. Das Zusammenspiel der Zellen nach Christobalitinhalation

Die Alveolarmakrophagen werden durch die Phagozytose von Partikeln aktiviert und können dann z.B. proinflammatorische Zytokine, Chemokine und reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies freisetzen. Für eine vollständige Stimulation von Makrophagen sind jedoch zwei separate Signale notwendig (Gemsä und Kozan, 1984; Hamilton und Adams, 1987). Der eine Reiz wird sicher durch die Aufnahme von Christobalit-Partikeln ausgelöst und der zweite möglicherweise von umliegenden Zellen beigesteuert.

In ex vivo-Untersuchungen zeigten Alveolarmakrophagen aus Ratten mit Silikose basal keine erhöhte Produktion von TNF- $\alpha$ . Nach LPS-Stimulation produzierten jedoch Makrophagen aus erkrankten Tieren signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Mengen im Vergleich zu Makrophagen aus gesunden Tieren, was für eine Voraktivierung der Zellen spricht (Mohr et al., 1991). Gossart et al. (1996) wiesen in einem Instillationsmodell erhöhte Mengen an TNF- $\alpha$ -mRNA und



-Protein in der BAL nach, wobei sich die Spiegel nach 28 Tagen p. e. wieder normalisiert hatten. Die Beobachtung, daß die Verabreichung von Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  zu einer milderen Fibrose nach Staubexposition führt (Piguet et al. 1990), kann also möglicherweise durch eine verminderte Entzündungsreaktion am Anfang der Krankheitsentstehung erklärt werden.

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit der Makrophagen nach Phagozytose von Partikeln ist die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen. Für letztere ist die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase erforderlich. Mittels RT-PCR konnte in Zellen der BAL silikotischer Tiere eine signifikant verstärkte Expression der iNOS-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 32), wobei in der Gesamtlunge (Abb. 31) und in der Population der interstitiellen Zellen (Abb. 33) kein Unterschied zu verzeichnen war. Das deutet darauf hin, daß auch in der chronischen Phase der Erkrankung wesentliche Entzündungsreaktionen in den Alveolen ablaufen. Auch die neutrophilen Granulozyten können iNOS produzieren und tragen wahrscheinlich neben den Makrophagen zu der erhöhten Expression der iNOS-mRNA in den Zellen aus der BAL bei. Auch Blackford et al. (1994) fanden nach Instillation von SiO<sub>2</sub> eine erhöhte Genexpression von iNOS in Alveolarmakrophagen und PMN.

In dieser Arbeit wurden Chemokine untersucht, die unter anderem durch TNF- $\alpha$  oder reaktive Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen in verschiedenen Zellen induziert werden können.

TNF- $\alpha$  ist in der Lage, in Alveolarmakrophagen die Produktion von MIP-1 $\alpha$  und MIP-2 zu induzieren (Driscoll et al., 1993a). Driscoll et al. (1993) stimulierte auch Epithelzellen und Fibroblasten aus der Ratte ex vivo mit TNF- $\alpha$  und konnte eine erhöhte Expression von MIP-2-mRNA, aber nicht der MIP-1 $\alpha$ -mRNA detektieren. Da lediglich MIP-1 $\alpha$  in der chronischen Phase verstärkt in den Zellen der Lunge produziert wird, scheint TNF- $\alpha$  in unserem Modell (12 Monate p. e.) keine entscheidende Rolle mehr zu spielen. Bestätigt wird das durch die Fieberfreiheit der Tiere, was bei einer verstärkten Produktion des Pyrogens TNF- $\alpha$  nicht der Fall wäre.

Die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die Induktion von Chemokin-mRNA-Expression in Epithelzellen haben Lakshminarayanan et al. (1997)

anhand von in vitro-Versuchen eingehend untersucht. Diese Arbeitsgruppe konnte in Ratten-Typ-II-Pneumozyten der Linie A549 nachweisen, daß durch  $\text{TNF-}\alpha$  sowohl eine Expression von RANTES als auch von MCP-1 induziert wird, während eine Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  lediglich die MCP-1-mRNA erhöht. Da in unserem Modell der Silikose im chronische Stadium nur MCP-1, nicht aber RANTES signifikant erhöht in den erkrankten Tieren zu finden war, ist dies ein weiteres Indiz dafür, daß  $\text{TNF-}\alpha$  in der chronischen Phase keine bedeutende Rolle mehr spielt, und die Regulation von MCP-1 möglicherweise über reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen erfolgt.

Ein Modell zur Krankheitsausbildung sieht den Ursprung der Reaktionen in einer Aktivierung der Makrophagen und PMN durch die Phagozytose von Christobalit, welche eine erhöhte Bildung von iNOS in diesen Zellen auslöst. Die resultierende Freisetzung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies induziert dann wiederum in den Epithelzellen die Expression verschiedener Chemokine, wie z.B. der MCP-1-mRNA, die eine Anlockung neuer Zellen bewirkt. Weiterhin setzen auch die Makrophagen im aktivierten Zustand chemotaktisch wirksame Mediatoren frei und sezernieren Zytokine, die das Wachstum und den Aktivierungsgrad der umliegenden Zellen beeinflussen können. Bei der chronischen Silikose finden sich zum Beispiel hyperplastisch veränderte Typ-II-Pneumozyten (Miller et al., 1987). Ursächlich dafür könnte das  $\text{TGF-}\alpha$  sein, das von Makrophagen freigesetzt und mitogen auf Epithel- und Mesenchymzellen wirkt. In Zellüberständen von ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen aus Ratten mit Silikose fanden sich für  $\text{TGF-}\alpha$  5-fach erhöhte Proteinmengen (Absher et al., 1993). Auch Melloni et al. (1994) wiesen in Zellüberständen von Alveolarmakrophagen die mit Silikapartikeln inkubiert worden waren, erhöhte Mengen an wachstumsstimulierenden Faktoren wie PDGF, IGF-1 und FGF nach.

Möglicherweise verfestigt sich eine Silikose über eine anfängliche Aktivierung der Makrophagen, was dann zu einer Umwandlung des Funktionsprofils anderer Lungenzellen führt. Lyonaga et al. (1994) postulieren zum Beispiel, daß die in Typ-II-Pneumozyten erhöhte MCP-1 Produktion ein Ausdruck ihrer metaplastischen Umwandlung sei.

Neben der Stimulation der Epithelzellen durch Mediatoren aus Makrophagen ist aber auch eine direkte Veränderung oder Schädigung der Pneumozyten durch den Kontakt mit Siliziumdioxidverbindungen möglich (Churg, 1996).

In Typ-I-Pneumozyten konnte eine Aufnahme von  $\text{SiO}_2$ -Partikeln in das Zytoplasma nachgewiesen werden (Bowden und Adamson, 1984; Brody et al., 1982). Die Christobalitpartikel können zum Beispiel über Lipidperoxidation (Goodglick et al., 1989) oder Veränderung der Kalzium-Homöostase (Gleva et al., 1990) zum Zelluntergang führen und eine regenerative Proliferation der Typ-II-Pneumozyten erfordern. Diese Proliferation könnte mit einer gesteigerten Bildung von Chemokine einhergehen, die dann Makrophagen anlocken, welche die Immunabwehr in den Alveolen verbessern können.

Möglicherweise korreliert das Ausmaß der Fibrose mit dem Verhältnis zwischen applizierter Dosis und den Alveolarmakrophagen. Werden fast alle Partikel phagozytiert, tritt eine Veränderung des Epithels durch die Zytokine der aktivierten Makrophagen ein. Liegt eine Überdosierung an Partikeln in der Alveole vor, kommt es zum Übertritt in die Pneumozyten oder direkt in das Interstitium. Nach Adamson und Bowden (1990) stellt die Bildung von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren durch stimulierte interstitielle Makrophagen den entscheidenden Mechanismus zur Auslösung einer Fibrose dar. Außerdem beobachteten Peterson et al. (1993) nach Asbestexposition eine erhöhte Permeabilität der Epithelzellen, so daß Partikel, aber auch Zytokine von Alveolarmakrophagen vermehrt in das Interstitium übertreten und die interstitiellen Makrophagen durch diese Signale aktiviert werden können.

Möglicherweise geschieht dieser Vorgang bei der chronischen Silikose schleichend. Die Alveolarmakrophagen sind anfänglich in der Lage, alle in die Alveolen gelangenden Partikel zu inkorporieren. Sie können sie jedoch nicht abbauen und werden in ihrer Funktion verändert (Kane, 1994).

Adamson et al. (1989) wiesen in Mäusen, deren Makrophagen durch Ganzkörperbestrahlung geschädigt worden waren, nach  $\text{SiO}_2$ -Exposition einen vermehrten Übertritt von Partikeln in das Interstitium nach, und es resultierte eine stärkere Fibrose. Die Veränderung der epithelialen und der interstitiellen

Zellen und deren Produktion von Chemokinen und Zytokinen ist ein wesentlicher Faktor der Ausbildung einer Fibrose.

Die veränderte Chemokinexpression bei der chronischen Silikose ist sowohl Ausdruck bereits erfolgter Umbauvorgänge, aber auch ein Anzeichen für die weiterhin erforderliche Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl von funktionstüchtigen Immunzellen. Die zentrale Stellung der Chemokine bei der Regulation der Immunantwort gibt Anlaß zur Frage nach therapeutischen Ansatzmöglichkeiten

Bis heute gibt es keine kausale Therapie der Silikose. Neben der Expositionsprophylaxe werden jedoch Glukokortikoide und andere Immunsuppressiva zur Hemmung des entzündlichen Geschehens eingesetzt. Möglicherweise basiert deren entzündungshemmender Effekt auch darauf, daß sie die Genexpression bestimmter Chemokine hemmen können. Grove und Plumb (1993) beschrieben in der Promotorregion von MIP-1 $\alpha$  eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, dessen Aktivität durch Glukokortikoide gebremst werden kann. In kultivierten Zellen des Epithels der Trachea und der Bronchien aus Ratten ließ sich zeigen, daß die konstitutive Expression von MCP-1 durch Dexamethason vermindert werden kann (Yamamoto et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben die Chemokinexpression in diversen Zellen der Lunge nach Christobalitinhalation. Dabei werden differentielle Expressionen in den einzelnen Kompartimenten deutlich, die Ausdruck eines komplexen Zusammenspiels der Zellen untereinander sind.

## 5. Zusammenfassung

Nach Inhalation von anorganischen Partikeln kann es zur Ausbildung einer Lungenfibrose, einer Pneumokoniose, kommen. Die Silikose stellt eine solche chronisch-fibrotische Veränderung des Lungengewebes nach Inhalation von Siliziumdioxidverbindungen dar. Dabei kommt es in Abhängigkeit von der Größe der inhalierten Partikel und ihrer Beschaffenheit zu einer komplexen Folgereaktion in der Lunge, die stark durch den Einstrom immunkompetenter Zellen geprägt wird.

Zur Untersuchung der chronisch unkomplizierten Silikose wurde ein etabliertes Tiermodell verwendet, bei dem Ratten über 8 Tage lang niedrig-dosiert Christobalit inhalierten und infolgedessen eine Silikose entwickelten. Zum Zeitpunkt der Präparation, 12 Monate nach Exposition, waren die Tiere in einem guten Gesundheitszustand. Dieses tierexperimentelle Modell simuliert die Situation im Menschen, bei dem der Expositionszeitpunkt meist länger zurückliegt und der fibrotische Umbau der Lunge bereits erfolgt ist.

In der chronischen Silikose kommt es neben dem fibrotischen Umbau der Lunge auch zu einer Zunahme von Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen in den Alveolen und im Interstitium.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die veränderte Leukozyten-Zusammensetzung der Lunge in der chronischen Silikose mit der Expression chemotaktisch wirksamer Zytokine zu korrelieren. Dazu wurde die Genexpression verschiedener CC- und CXC-Chemokine mittels RT-PCR in der Gesamtlunge, als auch in den separaten Zellpräparationen aus Alveolarraum und Interstitium untersucht.

Der Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF), der die Abwanderung von Leukozyten vom Ort der Entzündung hemmt, wird bei der Silikose nicht vermehrt exprimiert. Dieser Befund legt nahe, daß die beobachtete, lokale Leukozytose der Lunge bei der Silikose auf einer vermehrten Rekrutierung von Zellen aus dem Blutstrom zurückzuführen ist. Meine Ergebnisse zeigen eine erhöhte Gen-Expression der monozytenanlockenden Chemokine MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  in der Gesamtlunge. RANTES, ebenfalls ein CC-Chemokin, wird unerwarteterweise vermindert exprimiert. Lediglich in den Zellen aus der BAL finden sich bei der

Silikose eine vermehrte Expression von RANTES, welches möglicherweise den Übertritt der Monozyten vom Interstitium in die Alveolen unterstützt.

Zur erhöhten Expression von MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  scheinen zu diesem späten Zeitpunkt nach Christobalit-Inhalation nicht nur Makrophagen, sondern auch die Epithelzellen und Fibroblasten beizutragen. Speziell die Typ-II-Pneumozyten, die eine Vielzahl an Chemokinen produzieren können, sind bei der Silikose hyperplastisch verändert. Zu diesem späten Zeitpunkt der Silikose führt die mit der hyperplastisch-metaplastischen Alteration verbundene Freisetzung von CC-Chemokinen zur Anlockung und Aktivierung neuer Makrophagen.

In den Zellen des Bronchoalveolarraumes silikotischer Tiere wird die iNOS-mRNA vermehrt exprimiert. Die resultierende gesteigerte Freisetzung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies verursacht eine fortdauernde Entzündung. Da die Makrophagen die Siliziumdioxidverbindungen nicht abbauen können, werden sie in ihrer Funktionstüchtigkeit so verändert, daß eine erhöhte Aktivierung mit gesteigerter Chemokinfreisetzung persistiert. Die Partikel werden auch in das Interstitium verlagert und irritieren die dort ansässigen, interstitiellen Makrophagen. Dieser Reiz in unmittelbarer Nähe zu Fibroblasten führt dann zu einer Aktivierung und verstärkten Bildung von Extrazellulärmatrix und damit zur Fibrose. Die Chemokine sind an vielen Schritten dieser Krankheitsmanifestation beteiligt und unterhalten über eine andauernde Freisetzung aus Epithelzellen und Makrophagen die chronische Entzündung.

## 6. Literaturverzeichnis

**Absher, M.**, Sjostrand, M., Baldor, L.C., Hemenway, D.R., Kelley, J. (1993): Patterns of secretion of transforming growth factor-alpha in experimental silicosis. Acute and subacute effects of cristobalite exposure in the rat. *Reg. Immunol.* 5(3-4): 225-231.

**Absher, M.P.**, Hemenway, D.R., Leslie, K.O., Trombley, L., Vacek, P. (1992): Intrathoracic distribution and transport of aerosolized silica in the rat. *Exp. Lung Res.* 18: 743-757.

**Absher, M.P.**, Trombley, L., Hemenway, D.R., Mickey, R.M., Leslie, K.O. (1989): Biphasic cellular and tissue response of rat lungs after eight-day aerosol exposure to the silicon dioxide cristobalite. *Am. J. Pathol.* 134: 1243-1251.

**Adamson, I.Y.**, Letourneau, H.L., Bowden, D.H. (1989): Enhanced macrophage-fibroblast interactions in the pulmonary interstitium increases fibrosis after silica injection to monocyte-depleted mice. *Am. J. Pathol.* 134(2): 411-418.

**Adamson, I.Y.**, Letourneau, H.L., Bowden, D.H. (1991): Comparison of alveolar and interstitial macrophages in fibroblast stimulation after silica and long or short asbestos. *Lab. Invest.* 64(3): 339-344.

**Adamson, I.Y.R.**, Bowden, D.H. (1978): Adaptive response of the pulmonary macrophagic system to carbon, II: morphologic studies. *Lab. Invest.* 38: 430-438.

**Adamson, I.Y.R.**, Bowden, D.H. (1985): Role of polymorphonuclear leukocytes in silica-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 117: 37-43.

**Adamson, I.Y.R.**, Bowden, D.H. (1990): Pulmonary reaction to long and short asbestos fibers is independent of fibroblast growth factor production by alveolar macrophages. *Am. J. Pathol.* 137: 523-529.

**Alam, R.**, Forsythe, P.A., Stafford, S., Lett-Brown, M.A., Grant, J.A. (1992): Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. *J. Exp. Med.* 176(3): 781-786.

**Alam, R.,** Kumar, D., Anderson-Walters, D., Forsythe, P.A. (1994): Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reaction and activate murine mast cells in vivo. *J.Immunol.* 152(3): 1298-1303.

**Allison, A.C.,** Harington, J.S., Birbeck, M. (1966): An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. Exp. Med.* 124: 141-154.

**Amann, S.** (1996): Morphologische und funktionelle Untersuchungen zur Rolle interstitieller und alveolarer Lungenmakrophagen bei der Entstehung der Silikose in Ratten. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin. Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg.

**Ansorge, W.** (Hrsg.), Erfle, H., Grothues, D., Rupp, D., Schwager, S., Sense, C., Wiemann, S., Schilke, A., Stegemann, J., Voie, A.M., Voss, H., Zimmermann, J. (1993): EMBO practical course 1993: DNA sequencing: advanced approaches, automated methods and analysis.

**Antonini, J.M.,** Reasor, M.J. (1994): Effect of short-term exogenous pulmonary surfactant treatment on acute lung damage associated with the intratracheal instillation of silica. *J. Toxicol. Environ. Health* 43(1): 85-101.

**Bacher, M.,** Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsä, D., Donnelly, T., Bucala, R. (1996): An essential role for macrophage migration inhibitory factor in T- cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7849-7854.

**Baggiolini, M.,** Dewald, B., Moser, B. (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55: 97-179.

**Bazan, J.F.,** Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., Schall, T.J. (1997): A new class of membrane-bound chemokine with a CX<sub>3</sub>X-motif. *Nature* 385: 640-644.

**Becker, S.,** Quay, J., Koren, H.S., Haskill, J.S. (1994): Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 266(3 Pt 1): L278-L286.

**Beckett, W.,** Abraham, J., Becklage, M., Christiani, D., Cowie, R., Davis, G., Jones, R., Kreiss, K., Parker, J., Wagner, G. (1997): Adverse Effects of Crystalline Silica Exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 761-765.



**Bernhagen, J.**, Bacher, M., Calandra, T., Metz, C.N., Doty, S.B., Donnelly, T., Bucala, R. (1996): An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J. Exp. Med.* 183(1): 277-282.

**Bernhagen, J.**, Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, M.J., Voelter, W., Manogue, K.R., Cerami, A., Bucala, R. (1993): MIF is a pituitary- derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365: 756-759.

**Blackford, J.A.Jr.**, Antonini, J.M., Castranova, V., Dey, R.D. (1994): Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxid production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11: 426-431.

**Blackford, J.A.Jr.**, Jones, W., Dey, R.D., Castranova, V. (1997): Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron or titanium dioxide in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 51: 203-218.

**Blocki, F.A.**, Ellis, L.B.M., Wackett, L.P. (1993): MIF proteins are theta- class glutathione- S- transferase homologs. *Prot. Science* 2: 2095-2102.

**Bloom, B.R.**, Bennet, B. (1966): Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed- type hypersensitivity. *Science* 153: 80-82.

**Blusse van Oud Alblas, A.**, van Furth, R. (1979): Origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 149: 1504-1518.

**Bogdan, C.**, Nathan, C. (1993): Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4 and interleukin-10. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 685: 713-739.

**Boitelle, A.**, Gosset, P., Copin, M.C., Vanhee, D., Marquette, C.H., Wallaert, B., Gosselin, B., Tonnel, A.B. (1997): MCP-1 secretion in lung from nonsmoking patients with coal worker's pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 10(3): 557-562.

**Bowden, D.H.**, Adamson, I.Y.R. (1984): Pathway of cellular efflux and particle clearance after carbon instillation to the lung. *J. Pathol.* 143: 117-125.

**Bowden, D.H.**, Adamson, I.Y.R. (1984a): The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis. *J. Pathol.* 144: 149-161.

**Bowden, D.H.**, Hedgecock, C., Adamson, I.Y.R. (1989): Silica-induced pulmonary fibrosis involves the reaction of particles with interstitial rather than alveolar macrophages. *J. Pathol.* 158: 73-80.

**Brain, J.D.** (1988): Lung macrophages: how many kinds are there? What do they do? *Am. Rev. Respir. Dis.* 137(3): 507-509.

**Brody, A.R.**, Roe, M.W., Evans, J.N., Davis, G.S. (1982): Deposition and translocation of inhaled silica in rats. Quantification of particle distribution, macrophage participation and function. *Lab. Invest.* 47: 533-542.

**Bucala, R.** (1994): MIF, a previously unrecognised pituitary hormone and macrophage cytokine, is a pivotal mediator in endotoxic shock. *Circ. Shock* 44: 35-39.

**Butcher, E.C.**, Picker, L.J. (1996): Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60-66.

**Calandra, T.**, Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Bucala, R. (1994): The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 179: 1895-1902.

**Callis, A.H.**, Sohnle, P.G., Mandel, G.S., Mandel, N.S. (1986): The role of complement in experimental silicosis. *Environ. Res.* 40: 301-312.

**Caplan, A.** (1953): Certain unusual radiological appearances in the chest of coal miners suffering from rheumatoid arthritis. *Thorax* 8: 29.

**Carr, M.W.**, Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., Springer, T.A. (1994): Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3652-3656.

**Carre, P.C.**, Mortenson, R.L., King, T.E.Jr., Noble, P.W., Sable, C.L., Riches, D.W. (1991): Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* 88(6): 1802-1810.

**Celada, A.,** Nathan, C. (1994): Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* 15(3): 100-102.

**Chandler, D.B.,** Kennedy, J.J., Fulmer, J.D. (1986): Studies of membrane receptors, phagocytosis, and morphology of subpopulations of rat interstitial macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 542-547.

**Chang, H.C.,** Hsu, F., Freemann, G.J., Griffin, J.D., Reinherz, E.L. (1989): Cloning and expression of gamma-interferon-inducible gene in monocytes: A new member of a cytokine family. *Int. Immunol.* 1: 388-397.

**Chen, B.D.M.,** Mueller, M., Chou, T.H. (1988): Role of GM-CSF in the regulation of murine alveolar macrophage proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 141: 139-144.

**Chen, J.,** Armstrong, L.C., Liu, S.J., Gerriets, J.E., Last, J.A. (1991): Silica increases cytosolic free calcium ion concentration of alveolar macrophages in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111(2): 211-220.

**Churg, A.** (1996): The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 1124-1140.

**Claudio, E.,** Segade, F., Wrobel, K., Ramos, S., Lazo, P.S. (1995): Activation of murine macrophages by silica particles in vitro is a process independent of silica-induced cell death. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13(5): 547-554.

**Clore, G.M.,** Gronenborn, A.M. (1995). Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB-J.* 9: 57-62.

**Conti, P.,** Pang, X., Boucher, W., Letourneau, R., Reale, M., Barbacane, R.C., Thibault, J., Theoharides, T.C. (1997): Monocyte chemotactic protein-1 is a proinflammatory chemokine in rat skin injection sites and chemoattracts basophilic granular cells. *Int. Immunol.* 9(10): 1563-1570.

**Cowie, R.L.** (1994): The epidemiology of tuberculosis in gold miners with silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 1460-1462.

**Crapo, J.D.,** Young, S.L., Fram, E.K., Pinkerton, K.E., Barry, B.E., Crapo, R.O. (1983): Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: 542-546.

**Cunha, F.Q.**, Weiser, W.Y., David, J.R., Moss, D.W., Moncada, S., Liew, F.Y. (1993): Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages. *J. Immun.* 150(5): 1908-1912.

**Damoiseaux, J.G.**, Döpp, E.A., Calame, W., Chao, D., MacPherson, G.G., Dijkstra, C.D. (1994): Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83: 140-147.

**David, J.** (1966): Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 56: 72-77.

**Davis, G.S.** (1986): Pathogenesis of silicosis: current concepts and hypotheses. *Lung* 164: 139-154.

**Davis, G.S.**, Brody, A.R., Craighead, J.E. (1978): Analysis of airspace and interstitial mononuclear cell populations in human diffuse interstitial lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118: 7-15.

**Davis, G.S.**, Gemsa, D. (1996). Immunopathogenesis of silicosis. In: *Immunopathology of Lung Disease.* (Eds. Kradin, R.L., Robinson, B.W.S.) Butterworth- Heinemann Verlag, Boston, Singapore: 445-467.

**Dethloff, L.A.**, Gladen, B.C., Gilmore, L.B., Hook, G.E.R. (1985): Quantitation of cellular and extracellular constituents of the pulmonary lining in rats by using bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 899-907.

**Deuel, T.F.**, Keim, P.S., Farmer, M., Henrikson, R.L. (1977): Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2256-2258.

**Deutsche Forschungsgemeinschaft** (1997): MAK- und BAT-Liste 1997. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Mitteilung 33. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. S.88.

**Deutsches Ärzteblatt** (Dez. 1993): Die häufigsten anerkannten Berufskrankheiten.

**Devergne, O.**, Marfaing-Koka, A., Schall, T.J., Leger-Ravet, M.B., Sadick, M. (1994): Produktion of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J. Exp. Med.* 179: 1689-1694.

**Dinareello, C.A.**, Wolff, S.M. (1993): The role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. J. Med.* 328: 106-113.

**Dobbs, L.G.**, Gonzalez, A., Williams, M.C. (1986): An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 141-145.

**Doll, N. J.**, Stankus, R.P., Hughes, F., Weill, H., Gurta, R.C., Rodriguez, M., Jones, R., Alöspaugh, M.A., Salvaggio, J.E. (1981): Immune complexes and autoantibodies in silicosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68: 281-285.

**Donnelly, S.C.**, Bucala, R. (1997): Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with critical role in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 3(11): 502-507.

**Donnelly, S.C.**, Haslett, C., Reid, P.T., Grant, I.S., Wallace, W.A.H., Metz, C.N., Bruce, L.J., Bucala, R. (1997): Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med.* 3(3): 320-323.

**Driscoll, K.E.** (1994): Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp. Lung Res.* 20(6): 473-490.

**Driscoll, K.E.**, Deyo, L.C., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G., Bertram, T.A. (1997): Effects of particle exposure and particle- elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* 18(2): 423-430.

**Driscoll, K.E.**, Hassenbein, D.G., L.C., Carter, Poynter, J., Asquih, T.N., Grant, R.A., Whitten, J., Purdon, M.P., Takigiku, R. (1993a): Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: Expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8: 311-318.

**Driscoll, K.E.**, Lindenschmidt, R.C., Maurer, J.K., Higgins, J.M., Ridder, G. (1990): Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2(4): 381-390.

**Driscoll, K.E.**, Maurer, J.K., Hassenbein, D., Carter, J., Janssen, Y.M.W., Mossman, B.T., Osier, M., Oberdörster, G. (1994): Contribution of macrophage-derived cytokines and cytokine networks to mineral dust-induced lung inflammation. in: Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract. Ed. Mohr, U., ILSI Press, Washington, D.C.: 199-206.

**Driscoll, K.E.**, Simpson, L., Carter, J., Hassenbein, D., Leikauf, G.D. (1993): Ozone inhalation stimulates expression of a neutrophil chemotactic protein, macrophage inflammatory protein 2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119(2): 306-309.

**Emerson, R.J.**, Davis, G.S. (1983): effect of alveolar lining material-coated silica on rat alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* 51: 81-84.

**Fahey, T.J.III.**, Tracey, K.J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L.S., Jones, W.G., Shires, G.T., Cerami, A., Sherry, B. (1992): Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* 148: 2764-2769.

**Farber, J.M.** (1993): Hu Mig: a new member of the chemokine family of cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 223-230.

**Finkelstein, J.N.** (1994): Cell- cell interactions and the role of epithelial cells in the pulmonary response to particulate injury. in: Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract. Ed. Mohr, U., ILSI Press, Washington, D.C.: 199-206.

**Frevert, C.W.**, Farone, A., Danaee, H., Paulauskis, J.D., Kobzik, L. (1995): Functional characterisation of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2. *Inflammation* 19(1): 133-142.

**Friedetzky, A.** (1997): Silikose im Rattenmodell: Veränderungen in der Lunge und in den lymphatischen thorakalen Organen nach Siliziumdioxid-Exposition. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.

**Fubini, B.**, Giamello, E., Volante, M., Bolis, V. (1990): Chemical functionalities at the silica surface determining its reactivity when inhaled. Formation and reactivity of surface radicals. *Toxicol. Ind. Health* 6: 571-598.

**Gardner, L.U.** (1923): Studies on the relation of mineral dusts to tuberculosis III. The relatively early lesions in experimental pneumokoniosis produced by carborundum inhalation and their influence on pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Tuberc.* 7: 344-347.

**Garn, H.,** Friedetzky, A., Davis, G.S., Hemenway, D.R., Gemsa, D. (1997): T-lymphocyte activation in the enlarged thoracic lymph nodes of rats with silicosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16: 309-316.

**Gavett, S.H.,** Carakostas, M.C., Belcher, L.A., Warheit, D.B. (1992): Effect of circulating neutrophil depletion on lung injury induced by inhaled silica particles. *J. Leukoc. Biol.* 51(5): 455-461.

**Gemsa, D.,** Kozan, B. (1984): Entzündungszellen. *Allergologie* 7: 183-194.

**Gharaee-Kermani, M.,** Denholm, E.M., Phan, S.H. (1996): Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J. Biol. Chem.* 271(30): 17779-17784.

**Gleva, G.F.,** Goodglick, L.A., Kane, A.B. (1990): Altered calcium homeostasis in irreversibly injured P388D1 macrophages. *Am. J. Pathol.* 137(1): 43-57.

**Golde, D.W.,** Byers, L.A., Finley, T.N. (1974): Proliferative capacity of human alveolar macrophages. *Nature* 247: 373-375.

**Gong, J.L.,** McCarthy, K.M., Telford, J., Tamatani, T., Miyasaka, M. Schneeberger, E.E. (1992): intraepithelial airway dendritic cells: a distinct subset of pulmonary dendritic cells obtained by microdissection. *J. Exp. Med.* 175: 797-807.

**Goodglick, L.A.,** Pietras, L.A., Kane, A.B. (1989): Evaluation of the causal relationship between crocidolite asbestos-induced lipid peroxidation and toxicity to macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139(5): 1265-1273.

**Gossart, S.,** Cambon, C., Orfila, C., Seguelas, M.H., Lepert, J.C., Rami, J., Carre, P., Pipy, B. (1996): Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *J. Immunol.* 156: 1540-1548.

**Graves, D.T.,** Jiang, Y. (1995): Chemokines, a family of chemotactic cytokines. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 6: 109-118.

**Gregorini, G.,** Ferioli, A., Donato, F., Tira, P., Morassi, L., Tardanico, R., Lancini, L., Maiorca, R. (1993): Assoziation between silica exposure and necrotizing crescentic glomerulonephritis with p-ANCA and anti-MPO antibodies: a hospital- based case- control study. Advanc. Exp. Med. Biol. 336: 435-440.

**Greskötter, K.-R.** (1996): Pathologie/Klinische Medizin systematisch. Band I, 1. Aufl. UNI-MED Verlag AG, Lorch, Deutschland.

**Grove, M.,** Plumb, M. (1993): C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. Mol. Cell Biol. 13(9): 5276-5389

**Hamilton, T.A.,** Adams, D.O. (1987): Molecular mechanism of signal transduction in macrophages. Immunol. Today 8: 151-158.

**Haskill, S.,** Peace, A., Morris, J., Sporn, S.A., Anisowicz, A., Lee, S.W., Smith, T., Martin, G., Ralph, P., Sager, R. (1990): Identification of three related human GRO genes encoding cytokine function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7732-7736.

**Heeger, P.,** Wolf, G., Meyers, C., Sun, M.J., O'Farrell, S.C., Krensky, A.M., Neilson, E.G. (1992): Isolation and characterisation of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine RANTES. Kidney Int. 41: 220-225.

**Hemenway, D.R.,** Absher, M.P., Fubini, B., Bolis, V. (1993): What is the relationship between hemolytic potential and fibrogenicity of mineral dust? Arch. Environ. Health 48(5): 343-347.

**Hemenway, D.R.,** Absher, M.P., Trombley, L., Vacek, P.M. (1990): Comparative clearance of quartz and cristobalite from the lung. Am Ind. Hyg. Assoc. J. 51(7): 363-369.

**Hemenway, D.R.,** MacAskill, S.M. (1982): Design, development and test results of a horizontal flow inhalation toxicology facility. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 43: 874-879.



**Henderson, R.F.**, Driscoll, K.E., Harkema, J.R., Lindenschmidt, R.C., Chang, I.Y., Maples, K.R., Barr, E.B. (1995): A comparison of the inflammatory response of the lung to inhaled versus instilled particles in F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 24(2): 183-197.

**Hogquist, K.A.**, Nett, M.A., Unanue, E.R., Chaplin, D.D. (1991): Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(19): 8485-8489.

**Holt, P.G.**, Degebrod, A., Venaille, T., O'Leary, C., Krska, K., Flexmann, J., Farrell, H., Shellam, G., Young, P., Penhale, J. (1985): Preparation of interstitial lung cells by enzymatic digestion of tissue slices: preliminary characterisation by morphology and performance in functional assays. *Immunology* 54(1): 139-147.

**Holt, P.G.**, Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P.G., Kraal, G., Thepen, T. (1993): Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 177(2): 397-407.

**Howard, O.M.Z.**, Ben-Baruch, A., Oppenheim, J.J. (1996): Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *TIBTECH* 14: 46-51.

**Hubbard, A.K.** (1989): Role for T lymphocytes in silica-induced pulmonary inflammation. *Lab. Invest.* 61(1): 46-52.

**Hughes, J.M.** (1995): Radiographic evidence of silicosis in relation to silica exposures. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 10: 1064-1069.

**Iyer, R.**, Hamilton, R.F., Li, L., Holian, A. (1996): Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141(1): 84-92.

**Iyonaga, K.**, Takeya, M., Saita, N., Sakamoto, O., Yoshimura, T., Ando, M., Takahashi, K. (1994): Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum. Pathol.* 25(5): 455-463.

**Jiang, Y.**, Beller, D., Frendl, G., Graves, D. (1992): Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148: 2423-2428.

**Johansson, A.**, Lundborg, M., Sköld, C.M., Lundahl, J., Tornling, G., Eklund, A., Camner, P. (1997): Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16: 582-588.

**Johnson N.F.**, Smith, D.M., Sebring, R., Holland, L.M. (1987): Silica- induced alveolar cell tumors in rats. *Am. J. Ind. Med.* 11(1): 93-107.

**Johnston, C.J.**, Wright, T.W., Rubin, P., Finkelstein, J.N. (1998): Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis- resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. *Exp. Lung Res.* 24(3): 321-337.

**Kameyoshi, Y.**, Dorschner, A., Mallet, A.I., Christophers, E., Schröder, J.M. (1992): Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J. Exp. Med.* 176: 587-592.

**Kane, A.B.** (1994): Particle- and Fiber- induced Lesions: An Overview. in: Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract. Ed. Mohr, U., ILSI Press, Washington, D.C.: 3-16.

**Kane, A.B.**, Stanton R.P., Raymond, E.G., Dobson, M.E., Knafelc, M.E., Farber, J.L. (1980): Dissociation of intracellular lysosomal rupture from the cell death caused by silica. *J. Cell. Biol.* 87(3 Pt 1): 643-651.

**Kaplan, G.**, Luster, A.D., Hancock, G., Cohn, Z.A. (1987): The expression of a gamma interferon induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 166: 1098-1108.

**Kelner, G.S.**, Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., Zlotnik, A. (1994): Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266: 1395-1399.

**Kennedy, J.**, Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., bacon, K., Zlotnik, A. (1995): Molecular cloning and functional characterisation of human lymphotactin. *J. Immunol.* 155: 203-209.

**King, E.J.**, Mohanty, G.P., Harrison, C.V., Nagelschmidt, G. (1956): The action of flint of variable size injected at constant weight and constant surface into the lungs of rats. *Br. J. Ind. Med.* 10: 9-17.

**Kodama, N.**, Yamaguchi, E., Hizawa, N., Furuya, K., Kojima, J., Oguri, M., Takahashi, T., Kawakami, Y. (1998): Expression of RANTES by bronchoalveolar lavage cells in non-smoking patient with interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 18(4): 526-531.

**Konishi, T.**, Okabe, H., Katoh, H., Fujiyama, Y., Mori, A. (1996): Macrophage inflammatory protein-1 alpha in non-neoplastic and neoplastic lung tissue. *Virchows. Arch.* 428(2): 107-111.

**Koyama, S.**, Sato, E., Nomura, H., Kubo, K., Nagai, S., Izumi, T. (1997): Type II pneumocytes release chemoattractant activity for monocytes constitutively. *Am. J. Physiol.* 272(5 Pt 1): L830-L837.

**Kumar, R.K.** (1989): Quantitative immunohistologic assessment of lymphocyte populations in the pulmonary inflammatory response to intratracheal silica. *Am. J. Pathol.* 135: 605-614.

**Kuna, P.**, Reddigar, S., Ruchinski, D., Oppenheim, J.J., Kaplan, A. (1992): Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J. Exp. Med.* 175: 489-493.

**Kwon, O.J.**, Jose, P.J., Robbins, R.A., Schall, T.J., Williams, T.J., Barnes, P.J. (1995): Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12(5): 488-496.

**Lakshminarayanan, V.**, Beno, D.W., Costa, R.H., Roebuck, K.A. (1997): Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272(52): 32910-32918.

**Lapes, M.A.**, Napolitano, M., Heang, K.T., Chang, N.T., Leonard, W.J. (1988): Identification, cloning and characterisation of an immune activation gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9704-9708.

**Lavnikova, N.**, Prokhorova, S., Helyar, L., Laskin, D.L. (1993): Isolation and partial characterisation of subpopulations of alveolar macrophages, granulocytes, and highly enriched interstitial macrophages from rat lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8: 384-392.

**Lehnert, B.E.**, Valdez, Y.E., Holland, L.M. (1985): Pulmonary macrophages: alveolar and interstitial populations. *Exp. Lung Res.* 9: 177-190.

**Lohmann-Matthes, M.L.**, Steinmüller, C., Franke-Ullmann, G. (1994): Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* 7: 1678-1689.

**Lukacs, N.W.**, Chensue, S.W., Smith, R.E., Strieter, R.M., Warmington, K., Wilke, C., Kunkel, S.L. (1994): Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J. Pathol.* 144: 711-718.

**Luster, A.S.**, Unkeless, J.C., Ravetch, J.V. (1985): Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315: 672-676.

**Mason, R.J.**, William, M.C., Greenleaf, R.D. (1976): Isolation of lung cells. in: Bouhuys, A. (ed.). *Lung cells in disease*. Elsevier, Amsterdam, pp. 39-52.

**Matsukura, S.**, Kokubu, F., Kubo, H., Tomita, T., Tokunaga, H., Kadokura, M., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y., Ohno, T., Suzaki, H., Adachi, M. (1998): Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18(2): 255-264.

**Maune, S.**, Werner, J.A., Sticherling, M., Schroder, J.M. (1997): Fibroblasts obtained from human nasal, laryngeal and tracheal mucosa produce the chemokine RANTES. *Otolaryngol. Pol.* 51(1): 3-10.

**McDonald, J.C.** (1989): Silica, silicosis and lung cancer. *Br. J. Ind. Med.* 46: 289-291.

**McEver, R.P.** (1994): Selectins. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 75-84.

**Mehlhorn, J.**, Gerlach, C. (1990): Gemeinsames Auftreten von Silikose und Lupus erythematoses. *Z. Erkrank. Atm.org* 175: 38-41.

**Melloni, B.**, Lesur, O., Bouhadiba, T., Cantin, A., Begin, R. (1994): Partial characterisation of the proliferative activity for fetal lung epithelial cells produced by silica-exposed alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55: 574-580.

**Mestermann, S.**, Gelbmann, C., Köllinger, M., Schölmerich, J., Gross, V. (1997): accumulation of mast cells in fibrotic strictures in Crohn's disease. *Immunobiol.* 197: 287-288.

**Miller, B.E.**, Dethloff, L.A., Gladen, B.C., Hook, G.E.R. (1987): Progression of type II cell hypertrophy and hyperplasia during silica-induced pulmonary inflammation. *Lab. Invest.* 57(5): 546-554.

**Miller, M.D.**, Hata, S., De Waal Malefyt, R., Krangel, M.S. (1989). A novel polypeptide secreted by activated human T-lymphocytes. *J. Immunol.* 143: 2907-2916.

**Miller, M.D.**, Krangel, M.S. (1992): Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Critical Rev. Immunol.* 12: 17-46.

**Mohr, C.**, Davis, G.S., Graebner, C., Amann, S., Hemenway, D.R., Gerns, D. (1992b): Reduced release of leukotrienes B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> from alveolar macrophages of rats with silicosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7: 542-547.

**Mohr, C.**, Davis, G.S., Graebner, C., Hemenway, D.R., Gerns, D. (1992a): Enhanced release of prostaglandin E<sub>2</sub> from macrophages of rats with silicosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 390-396.

**Mohr, C.**, Gerns, D., Graebner, C., Hemenway, D.R., Leslie, K.O., Absher, P.M., Davis, G.S. (1991): Systemic macrophage stimulation in rats with silicosis: enhanced release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 395-402.

**Mossman, B.T.**, Churg, A. (1998): Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 1666-1680.

**Muhle, H.**, Takenaka, S., Mohr, U., Dasenbrock, C., Marmelstein, R. (1989): Lung tumor induction upon long- term low- level inhalation of crystalline silica. *Am. J. Ind. Med.* 15: 343-346.

**Mullis, K.B.** (1990): Eine Nachtfahrt und die Polymerase- Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft* 6: 60-67.

**Nakagawa, H.**, Shiota, S., Takano, K., Shibata, F., Kato, H. (1996): Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-2  $\alpha$ , a novel member of rat GRO/CINC family, is a predominant chemokine produced by lipopolysaccharide-stimulated rat macrophages in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220(3): 945-948.

**Nelson, D.J.**, McMenamin, C., McWilliam, A.S., Brenan, M., Holt, P.G. (1994): Development of the airway intraepithelial dendritic cell network in the rat from class II major histocompatibility (Ia)-negative precursors: differential regulation of Ia expression at different levels of the respiratory tract. *J. Exp. Med.* 179: 203-212.

**O'Brien, A.D.**, Standiford, T.J., Christensen, P.J., Wilcoxon, S.E., Paine, R.III. (1998): Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *J. Lab. Clin. Med.* 131(5): 417-424.

**Oppenheim, J.J.**, Zachariae, C.O.C., Mukaida, N., Matsushima, K. (1991): Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrin" cytokine family. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 617-648..

**Paine III, R.**, Rolfe, M.W., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Rollins, B.J., Strieter, R.M. (1993): MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J. Immunol.* 150(10): 4561-4570.

**Pan, Y.**, Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culepper, J., Gutierrez-Ramos, J.C., Gearing, D. (1997): Neurotactin, a membrane anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387: 611-617.

**Peterson, M.W.**, Walter, M.E., Gross, T.J. (1993): Asbestos directly increases lung epithelial permeability. *Am. J. Physiol.* 265: L308-L317.

**Petrek, M.**, Pantelidis, P., Southcott, A.M., Lympny, P., Safranek, P., Black, C.M., Kolek, V., Weigl, E., du Bois, R.M. (1997): The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 10(6): 1207-1216.

**Pforte, A.**, Gerth, C., Voss, A. (1993): Proliferating alveolar macrophages in BAL and lung function changes in interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 6: 951-955.

**Piguet, P.F.**, Collart, M.A., Grau, G.E., Sappino, A.-P., Vasalli, P. (1990): Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 344: 245-247.

**Pinkerton, K.E.**, Barry, B.E., O'Neil, J.J., Raub, J.A., Pratt, P.C., Crapo, J.D. (1982): Morphologic changes in the lung during the lifespan of Fischer-344 rats. *Am. J. Anat.* 164: 155-174.

**Policard, A.** (1967): The pneumocytes and their roles in pulmonary function. *Pathol. Biol.* 15(19): 973-981.

**Popesko, P.**, Rajtova, Horak, J. (1992): A colour atlas of anatomy of small laboratory animals. Vol. II. rat, mouse, hamster. Wolfe, London.

**Pratt, P.C.** (1983): Lung dust content and response in guinea pigs inhaling three forms of silica. *Arch. Environ. Health.* 38: 197-204

**Privalova, L.I.**, Katsnelson, B.A., Sharapova, N.Y., Kislitsina, N.S. (1995): On the relationship between activation and breakdown of macrophages in the pathogenesis of silicosis (an overview). *Med. Lav.* 86(6): 511-521.

**Proost, P.**, De wolf-Peeters, C., Conings, R., Opdenakker, G., Billiau, A., van Damme, J. (1993): Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. *J. Immunol.* 150: 1000-1010.

**Rathanaswami, P.**, Hachicha, M., Sadick, M., Schall, T.J., McColl, S.R. (1993): Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 268(8): 5834-5839.

**Richmond, A.**, Balentien, E., Thomas, H.G., Flaggs, G., Barton, D.E., Spiess, J., Bordon, R., Francke, U., Derynck, R. (1988): Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to beta-thromboglobulin. *EMBO J.* 7(7): 2025-33.

**Richmond, A.**, Thomas, H.G. (1988): Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J. Cell. Biochem.* 36(2): 185-98.

**Rodnan, G.P.**, Benedek, T.G., Medsger, T.A. Cammarata, R.J. (1967): The association of progressive systemic sclerosis (scleroderma) with coal miner's pneumoconiosis and other forms of silicosis. *Ann. Intern. Med.* 66: 323-334.

**Rollins, B.J.**, Morrison, E.D., Stiles, C.D. (1988): Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(11): 3738-3742.

**Rollins, G.J.**, Walz, A., Baggiolini, M. (1991): Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium influx, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78: 1112-1116.

**Rot, A.**, Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S.C., Schall, T.J., Dahinden, C.A. (1992): RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* 176: 1489-1495.

**Rubin, E.,** Farber, J.L. (1994): Pneumoconioses. in: Pathology. 2.Aufl. Edition Lippincott Camp. 593-617.

**Rustin , M.H.A.,** Bull, H.A., Ziegler, V., Merlhorn, J., Haustein, U.F., Maddison, P.J., James, J., Dowd, P.M. (1990): silica- associated systemic sclerosis is clinically, serologically and immunologically indistinguishable from idiopathic systemic sclerosis. Br. J. Dermatol. 123: 725-734.

**Sager, R.,** Anisowicz, A., Pike, M.C., Beckmann, P., Smith, T. (1992): Structural, regulatory and functional studies of the GRO gene and protein. In: Cytokines, Vol.4, Hrsg. M.Baggiolini, C.Sorg. Kager, Basel. S.96-116.

**Sakai, M.,** Nishihira, J., Hibiya, Y., Koyama, Y., Nishi, S. (1994): Glutathione binding rat liver 13k protein is the homologue of the macrophage migration inhibitory factor. Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3): 439-446.

**Sakanashi, Y.,** Takeya, M., Yoshimura, T., Feng, L., Morioka, T., Takahashi, K. (1994): Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. J. Leukoc. Biol. 56(6): 741-750.

**Sambrook, J.,** Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning, a laboratory manual. Sec. Ed. CSH (Cold Spring Harbor), Laboratory Press.

**Sanger, F.,** Niklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(12): 5463-5467.

**Sarafi, M.N.,** Garcia-Zepeda, E.A., MacLean, J.A., Charo, I.F., Luster, A.D. (1997): Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is structural and functional homologue of human MCP-1. J. Exp. Med. 185(1): 99-109.

**Schall, T.J.** (1997): Fractalkine - a strange attractor in the chemokine landscape. Immunol. Today 4: 147.

**Schall, T.J.,** Bacon, K.B. (1994): Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. COI 6: 865-873.

**Schall, T.J.,** Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davies, M.M., Krensky, A.M. (1988): A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. J. Immunol. 141: 1018-1025.



**Schall, T.J.**, O'Hehir, R.E., Goeddel, D.V., Lamb, J.R. (1992): Uncoupling of cytokine mRNA expression and protein secretion during the induction phase of T cell anergy. *J. Immunol.* 148: 381-387.

**Schmal, H.**, Shanley, T.P., Jones, M.L., Friedl, H.P., Ward, P.A. (1996): Role of macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *J. Immunol.* 156(5): 1963-1972.

**Sebring, R.J.**, Lehnert, B.E. (1992): Morphometric comparison of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Exp. Lung Res.* 18: 479-496.

**Seidel, H.-J.** (1995): Arbeitsmedizin in: Ökologisches Stoffgebiet. Duale Reihe, 2.Aufl. Hippokrates Verlag, Stuttgart: 108-113.

**Sherson, D.**, Lander, F. (1990): Morbidity of pulmonary tuberculosis among silicotic and nonsilicotic foundry workers in Denmark. *J. Occup. Med.* 2: 110-113.

**Shi, M.M.**, Godleski, J.J., Paulauskis, J.D. (1995): Molecular cloning and posttranscriptional regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha in alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211(1): 289-295.

**Siebels, M.**, Schulz, V., Andrassy, K. (1993): Silikose und Systemerkrankungen. *Immun. Infekt.* 21: 53-54.

**Silbernagel, S.**, Despopoulos, A. (1991): Taschenatlas der Physiologie. 4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, S. 80.

**Silicosis and Silicate Disease Committee** (1988): Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112: 673-720.

**Smith, R.E.**, Strieter, R.M., Phan, S.H., Lukacs, N.W., Huffnagle, G.B., Wilke, C.A., Burdick, M.D., Lincoln, P., Evanoff, H., Kunkel, S.L. (1994): Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury. *J. Immunol.* 153(10): 4704-4712.

**Smith, R.E.**, Strieter, R.M., Zhang, K., Phan, S.H., Standiford, T.J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. (1995): A role for CC-Chemokines in fibrotic lung disease. *J. Leukoc. Biol.* 57(5): 782-787.

**Standiford, T.J.**, Kunkel, S.L., Basha, M.B., Chensue, S.W., Lynch, J.P., Toews, G.B., Westwick, J., Strieter, R.M. (1990): Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line: a model for cytokine network in the lung. *J. Clin. Invest.* 86: 1945-1953.

**Standiford, T.J.**, Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., Strieter, R.M. (1991): Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type-II epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266: 9912-9918.

**Standiford, T.J.M.**, Rolfe, W., Kunkel, S.L., Lynch, J.P., Burdick, M.D., Gilbert, A.R., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Strieter, R.M. (1993): Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  expression in interstitial lung disease. *J. Immunol.* 151: 2852-2863.

**Strieter, R.**, Wiggins, R., Phan, S., Wharram, B., Showell, H., Remick, D., Chensue, S., Kunkel, S. (1989): Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 694-700.

**Strieter, R.M.**, Standiford, T.J., Huffnagle, G.B., Colletti, L.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. (1996): „The good, the bad and the ugly.“ The role of chemokines in models of human disease. *J. Immunol.* 156: 3583-3586.

**Struhar, D.**, Harbeck, R.J., Mason, R.J. (1989): Lymphocyte population in the lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid, and peripheral blood in rats at various times during the development of silicosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 28-32.

**Suzuki, N.**, Horiuchi, T., Ohta, K., Yamaguchi, M., Ueda, T., Takizawa, H., Hirai, K., Shiga, J., Ito, K., Miyamoto, T. (1993): Mast cells are essential for the full development of silica-induced pulmonary inflammation: a study with mast cell-deficient mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9(5): 475-483.

**Suzuki, N.**, Ohta, K., Horiuchi, T., Takizawa, H., Ueda, T., Kuwabara, M., Shiga, J., Ito, K. (1996): T-lymphocytes and silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *Thorax* 51(10): 1036-1042.

**Tabor, S.**, Richardson, C.C. (1990): DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.* 265(14): 8322-8328.

- Tashiro, K.**, Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., Honjo, T. (1993): Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261: 600-603.
- Taub, D.D.**, Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., Kelvin, D.J. (1993): Preferential migration of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science* 260: 355-358.
- Taub, D.D.**, Oppenheim, J.J. (1993): Review of the chemokine meeting the Third international Symposium of Chemotactic Cytokines. *Cytokine* 5: 175-179.
- Thor, D.E.**, Jureziz, R.E., Veach, S.R., Miller, E., Dray, S. (1968): Cell migration inhibition factor released by antigen from human peripheral lymphocytes. *Nature* 219: 755-757.
- Thurlbeck, W.M.** (1987): Environmental lung disease. In: *Pathology of the lung*. Thieme Medical Publishers Inc., New York, 594-685.
- Todd, R.**, Donoff, B.R., Chiang, T., Chou, M.Y., Elovic, A., Gallagher, G.T., Wong, D.T.W. (1991): The eosinophil is a cellular source of transforming growth factor- $\alpha$  in healing cutaneous wounds. *Am. J. Pathol.* 138: 1307-1313.
- Tourmann, J.L.**, Kaufmann, R. (1994): Biopersistence of the mineral matter of coal mine dusts in silicotic human lungs: is there a preferential release of iron? *Environ. Health Perspect.* 102(Suppl. 5): 265-268.
- Uber, C.L.**, McReynolds, R.A. (1982): Immunotoxicology of Silica. *Crit. Rev. Toxicol.* (CRC) Oct. 1982: 303-319.
- Uguccioni, M.**, Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S.H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M., Baggiolini, M. (1996): Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J. Exp. Med.* 183: 2379-2384.
- Valiante, D.J.**, Rosenman, K.D. (1989): Does silicosis still occur? *J. Am. Med. Ass. (JAMA)* 262: 3003-3007.
- Vallyathan, V.**, Kang, J.H., VanDyke, K., Dalal, N.S., Castranova, V. (1991): Response of alveolar macrophages to in vitro exposure to freshly fractured versus aged silica dust: the ability of Prosil 28, an organosilane material, to coat silica and reduce its biological reactivity. *J. Toxicol. Environ. Health* 33(3): 303-315.

**Vallyathan, V.**, Shi, X., Dalal, N.S., Irr, W., Castranova, V. (1988): Generation of free radicals from freshly fractured silica dust: potential role in acute silica-induced injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 1213-1219.

**Van Damme, J.**, Proost, P., Lenaerts, J.P., Opdenakker, G. (1992): Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2, MCP-3) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med.* 176: 59-65.

**Van der Brugge-Gamelkoorn, G.J.**, Dijkstra, C.D., Sminia, T. (1985): Characterisation of pulmonary macrophages and bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) macrophages in the rat. An enzyme-cytochemical and immunocytochemical study. *Immunobiol.* 169(5): 553-562.

**van Sprundel, M.P.** (1990): Pneumoconioses: the situation in developing countries. *Exp. Lung Res.* 16: 5.

**Vautrin, H. J.**, Morfeld, P., Kampmann, B. (1989): Vergleichende Untersuchungen zur Pneumokonioseentwicklung auf einem Bergwerk der Ruhrkohle AG im Hinblick auf eine Festsetzung des Grenzwertes für quarzhaltigen Kohlengrubenstaub. *Silikosebericht Nordrhein- Westfalen* 17. Verlag Glückauf, Essen: 297-333.

**Villiger, P.**, Terkeltaub, R., Lotz, M. (1992): Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. *J. Immunol.* 149: 722-727.

**Wagner, G.R.** (1997): Asbestosis and silicosis. *Lancet* 349: 1311-1315.

**Wagner, J.C.**, Burns, J., Munday, D.E., McGee, J. (1982): Presence of fibronectin in pneumoconiotic lesions. *Thorax* 37: 54-56.

**Wallace, W.E.**, Keane, M.J., Harrison, J.C., Stephens, J.W., Brower, P.S., Grayson, R.L., Attfield, M.D. (1995): Surface properties of silica in mixed dust. in: Castranova, V., Vallyathan, V., Wallace, W.E. (eds): *Silica and Silica-induced Disease*. CRC Press. Boca Raton, 107-120.

**Wallace, W.E.Jr.**, Vallyathan, V., Keane, M.J., Robinson, V. (1985): In vitro biologic toxicity of native and surface-modified silica and kaolin. *J. Toxicol. Environ. Health* 16: 415-424.

**Walz, A.**, Baggiolini, M. (1990): Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein of connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J. Exp. Med.* 171: 449-454.

**Walz, A.**, Burgener, R., Car, B., Baggiolini, M., Kunkel, S.L., Strieter, R.M. (1991): Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J. Exp. Med.* 174: 1355-1362.

**Walz, A.**, Peveri, P., Aschauer, H., Baggiolini, M. (1987): Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 755-761.

**Warheit, D.B.**, McHugh, T.A., Hartsky, M.A. (1995): Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand. J. Work Environ. Health* 21: 19-21.

**Watanabe, K.**, Koizumi, F., Kurashige, Y., Tsurufuji, S., Nakagawa, H. (1991): Rat CINC, a member of the interleukin-8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant in vivo. *Exp. Mol. Pathol.* 55(1): 30-37.

**Weill, H.**, Jones, R.N., Parkes, W.R. (1994): Silicosis and related diseases. In: Papes, W.R., *Occupational Lung Disorders*. 3. Aufl., Butterworth, London, 285-339.

**Weiser, W.Y.**, Temple, P.A., Witek- Gianotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C., David, J.R. (1989): Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl., Acad. Sci.* 86: 7522-7526.

**Wiessner, J.H.**, Mandel, N.S., Sohnle, P.G., Mandel, G.S. (1989): Effect of particle size on quartz-induced hemolysis and on lung inflammation and fibrosis. *Exp. Lung Res.* 15(6): 801-812.

**Williams, A.O.**, Flanders, K.C., Saffiotti, U. (1993): Immunohistochemical localisation of transforming growth factor- beta 1 in rats with experimental silicosis, alveolar type II hyperplasia and lung cancer. *Am. J. Pathol* 142: 1831-1840.

**Wizemann, T.M.**, Laskin, D.L. (1994): Enhanced phagocytosis, chemotaxis, and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoxemia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2: 358-365.

**Wolpe, S.D.**, Cerami, A. (1989): Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 3: 2565-2573.

**Wolpe, S.D.**, Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Moldawer, L.L., Nathan, C.F., Lowry, S.F., Cerami, A. (1988): Macrophages secrete a novel heparine-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167: 570-581.

**Work-Related Lung Disease Surveillance Report** (1994). Cincinnati, Ohio: National Institute for Occupational Safety and Health: DHHS (NIOSH) publication 94-120.

**Yamamoto, T.**, Ionaga, K., Takeya, M., Saita, N., Suga, M., Ando, M., Takahashi, K. (1998): Morphological alteration of cultured tracheobronchial epithelial cells is accompanied by the expression of chemokines MCP-1 and CINC/gro, in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 79(2): 81-92.

**Yla-Herttuala, S.**, Lipton, B., Rosenfeld, M.E., Sarkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Witztum, I.L., Steinberg, D. (1991): Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5252-5256.

**Yoshimura, T.**, Leonard, E.J. (1990): Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. *J. Immunol.* 144: 2377-2383.

**Yoshimura, T.**, Yuhki, N., Moore, S., Appella, E., Lerman, M.I., Leonard, E.J. (1989): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full length cDNA cloning, expression, in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244: 487-493.

**Yuen, I.S.**, Hartsky, M.A., Snajdr, S.I., Warheit, D.B. (1996): Time course of chemotactic factor generation and neutrophil recruitment in the lungs of dust-exposed rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15(2): 268-274.

**Zhang, K.**, Gharaee-Kermani, M., Jones, M.L., Warren, J.S., Phan, S.H. (1994): Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 153: 4733-4741.

---

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren  
Universitätsprofessoren:

Amon, Arnold, Aumüller, Aurich, Austermann, Aziz, Basler, Bauer, Baum,  
Beato, Berendes, Berger, Berndt, Bertalanffy, Besedowsky, Bien, Blankenburg,  
Braasch, Cetin, Czubayko, Daume, Daut, Dibbets, Dittrich, Dombrowski, Doss,  
Egbring, Eilers, Engel, Engenhardt-Cabillic, Eschenbach, Feuser, Flores de  
Jacoby, Friedrich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Garten, Gemsa, Geus, Göke,  
Golenhofen, Gotzen, Graul, Gressner, Griss, Gröne, Grundner, Grzeschik,  
Habermehl, Happle, Hardewig, Hartmann, Hasilik, Havemann, Hebebrand,  
Heeg, Hering, Heß, Hildebrand, Hilgermann, Hoffmann, Huffmann, Ihm, Jones,  
Joseph, Kälble, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Kern, Kleine, Kleinsasser,  
Klenk, Klötzer, Klose, Knoll, Koecke, Koolmann, Koransky, Kraft, Krause,  
Kretschmer, Krieg, Kroll, Küster, Kuhn, Kuni, Kußmann, Lang, Lange, Lauer,  
Lehmann, Lennartz, Lill, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lührmann, Lütcke, Maisch,  
Martini, Mannheim, Massarat, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Netter,  
Neurath, Niemeyer, Niessing, Oepen, Oertel, Petry, Pfab, Pieper, Podszus,  
Pohlen, Portig, Radsak, Rehder, Remschmidt, Richter, Riedmiller, Rinze,  
Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann,  
Schneider, Schüffel, Schulz, Schwarz, Schwerek, Seifart, Seitz, Seyberth,  
Siegrist, Slenczka, Steiniger, Strempel, Sturm, Sommer, Thomas, Unsicker,  
Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, v.Wichert, Wiegandt,  
Wolf.

---

## Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Gemsa, der in mir die Begeisterung für die Immunologie geweckt hat, und der diese Promotion an seinem Institut ermöglichte. Das von Ihnen geprägte, lebendige und offene Arbeitsklima hinterläßt in mir einen bleibenden Eindruck.

Herrn Dr. Garn danke ich herzlich für die intensive Betreuung bei theoretischen und praktischen Problemen dieser Arbeit. Er war, trotz meiner häufigen durch das Studium bedingten Unterbrechungen der Forschungstätigkeit, immer Ansprechpartner für mich. Dr. Anke Friedetzky danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, sie zeigte mir viele Tricks und „hielt die Tränenvase“ in schweren Zeiten.

Auch alle anderen Mitarbeitern des Institutes trugen wesentlich dazu bei, daß der Lebensabschnitt der Dissertation prägend für mich wurde. Dafür danke ich, Annette, Anja, Delia, Elfie, Elfriede, Gerda, Kathrin, Marianne, Marion, Ruth, Susanne, Ute, Andreas, Hans, Marc, Michael, Peter und Ralf.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Christof, der mir bei der Fertigstellung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand, und an dessen Seite ich ein sehr schönes und facettenreiches Leben erfahren darf.

Meinen Eltern Renate und Klaus Kirchner danke ich für die Aufmerksamkeit und Liebe, mit der sie meinen Werdegang gefördert haben, und ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre.